

Beatriz Lagunas Castán

Caracterización molecular y celular de la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados en plantas y su relación con la producción de oxilipinas

Departamento
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es
Alfonso Lozano, Miguel

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y CELULAR DE
LA BIOSÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS
POLIINSATURADOS EN PLANTAS Y SU RELACIÓN
CON LA PRODUCCIÓN DE OXILIPINAS

Autor

Beatriz Lagunas Castán

Director/es

Alfonso Lozano, Miguel

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2013



Estación Experimental de Aula Dei
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(CSIC)

Tesis Doctoral

**Caracterización molecular y celular de la
biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados
en plantas y su relación con la producción
de oxilipinas**

Memoria presentada por Dña. Beatriz Lagunas Castán,
Licenciada en Bioquímica, para optar al grado de Doctor por
la Universidad de Zaragoza

Zaragoza, 2013

ABREVIATURAS

ABA	Ácido abscísico
ACC	Acetil-CoA carboxilasa
ACP	Proteína transportadora de acilos
ADP	Difosfato de adenosina
ANA	Ácido naftalenico
AOC	Óxido de aleno ciclasa
AOS	Óxido de aleno sintasa
APS	Persulfato amónico
ATP	Trifosfato de adenosina
BC	Biotina carboxilasa
BCCP	Proteína portadora de biotina
β -MeOH	β -mercaptoetanol
BSA	Albúmina sérica bovina
cDNA	DNA complementario
CDP	Difosfato de citosina
Chl	Clorofila
CL	Cloroplasto
CoA	Coenzima A
COI	Del inglés, <u>C</u> ORONATINE <u>I</u> NSENSITIVE
Ct	Ciclo umbral
CT	Biotina transcarboxilasa
CTP	Trifosfato de citosina
DAG	Diacilglicerol
DAPI	4'-6-diamidino-2-fenilindol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DGDG	Digalactosildiacilglicerol
DHA	Ácido docosahexaenoico
DIC	Contraste de interferencia diferencial
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNasa	Desoxirribonucleasa I
dnOPDA	Ácido dinor-12-oxo-fitodienoico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ERF	Factor de respuesta a etileno
ET	Etileno

FAD	Desaturasa de ácido graso
FAS	Ácido graso sintasa
Fd	Ferredoxina
FID	Detector de ionización de llama
G3P	Glicerol-3-fosfato
GPAT	Glicerol-3-fosfato aciltransferasa
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacinaetanosulfónico
HIK	Histidina quinasa
ICE1	Del Inglés, <u>I</u> nducer of <u>C</u> BF <u>E</u> xpression
JA	Ácido jasmónico
JAZ	Del inglés, Jasmonate Zim-Domain
KAS	β -cetoacil-ACP sintasa
LB	Medio Luria Bertani
LHCII	Complejo de antena mayoritaria del fotosistema II
LOX	Lipoxigenasa
LPA	Ácido lisofosfatídico
LPAAT	Lisofosfatidil aciltransferasa
LTPs	Proteínas de transporte de lípidos
MCE	Del Inglés, <u>M</u> ycobacterial <u>C</u> ell <u>E</u> ntry
MeJA	Metil jasmonato
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
MGDG	Monogalactosildiacilglicerol
mRNA	RNA mensajero
MS	Medio Murashige-Skoog
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NADP ⁺	2'-Fosfodinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADPH	2'-Fosfodinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
OPDA	Ácido 12-oxo-fitodienoico
ORF	Marco abierto de lectura
PA	Ácido fosfatídico
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAP	Fosfatidato fosfatasa
PC	Fosfatidilcolina
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
pI	Punto isoeléctrico
PI	Fosfatidilinositol

PS	Fosfatidilserina
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
qRT-PCR	PCR cuantitativa en tiempo real
RACE	Del inglés, <u>R</u> ace <u>a</u> mplification of <u>c</u> DNA <u>e</u> nds
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RNasa H	Ribonucleasa H
r.p.m	revoluciones por minuto
SA	Ácido salicílico
SCF	Del inglés, <u>S</u> KP- <u>C</u> ullin- <u>F</u> -box
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SL	Sulfolípido
SQDG	Sulfoquinovosildiacilglicerol
TAG	Triacilglicerol
TEMED	N, N, N', N'-tetrametil-etil-N-diamina
TGDG	Trigalactosildiacilglicerol
Tm	Temperatura de hibridación
Tricina	N-tris(hidroximetil) metil glicina
Tris	(tris)-hidroximetil-amino metano
UTR	Región del mRNA que no se traduce
UV	Ultravioleta

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	LOS LÍPIDOS VEGETALES	1
1.1.1.	LÍPIDOS SIMPLES	1
1.1.1.1.	Ácidos grasos	2
1.1.1.2.	Ceras	3
1.1.1.3.	Triacilglicerolés	4
1.1.1.4.	Oxilipinas	4
1.1.2.	LÍPIDOS COMPLEJOS	5
1.1.2.1.	Esfingolípidos	5
1.1.2.2.	Cardiolipina	6
1.1.2.3.	Glicerolípidos	6
1.1.3.	CLASES DE GLICEROLÍPIDOS VEGETALES	9
1.1.3.1.	Galactolípidos	9
1.1.3.2.	Fosfolípidos	12
1.2.	SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN PLANTAS	15
1.3.	SÍNTESIS DE LÍPIDOS DE MEMBRANA EN PLANTAS	18
1.3.1.	DOS RUTAS DE SÍNTESIS	18
1.3.1.1.	La ruta procariota	19
1.3.1.2.	La ruta eucariota	21
1.3.1.3.	Plantas 16:3 y plantas 18:3	24
1.4.	DESATURASAS DE ÁCIDOS GRASOS	27
1.4.1.	Características de las desaturasas de ácidos grasos	27
1.4.1.1.	Secuencias conservadas en las desaturasas	33
1.4.1.2.	Estructura y topología transmembrana	38
1.4.2.	La reacción de desaturación	45
1.4.3.	Regulación de la actividad desaturasa	47
1.4.3.1.	Temperatura	47
1.4.3.2.	Desarrollo de la planta	54
1.5.	TRANSPORTE DE LÍPIDOS ENTRE MEMBRANAS	56
1.5.1.	Transporte de ácidos grasos fuera del cloroplasto	57
1.5.2.	Transporte de lípidos del retículo endoplásmico al cloroplasto	58
1.5.3.	Transporte de lípidos del cloroplasto al retículo endoplásmico	59
1.5.4.	Transporte de lípidos desde la envuelta interna del cloroplasto al tilacoide	60
1.5.5.	Otros tipos de transporte	60
2.	SITUACIÓN ACTUAL Y RETOS	63
2.1.	PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS BENEFICIOSOS PARA LA SALUD EN PLANTAS	63
2.2.	PRODUCCIÓN DE MATERIAS PRIMAS DE USO INDUSTRIAL (BIODIESEL)	65

3.	OBJETIVOS	68
3.1.	ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ω -3 DESATURASAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA HOJA EN SOJA	68
3.2.	LOCALIZACIÓN, ORGANIZACIÓN Y REGULACIÓN DE LAS ω -6 y ω -3 DESATURASAS PLASTIDIALES	68
3.3.	ESTUDIO DE LA OXILIPINA dnOPDA COMO FITOHORMONA PRECURSORA DEL ÁCIDO JASMÓNICO	68
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
4.1.	REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ω -3 DESATURASAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA HOJA EN SOJA	69
4.1.1.	Composición de ácidos grasos totales durante el desarrollo de la hoja en soja	72
4.1.2.	Análisis de clorofila total y proteína D1 durante el desarrollo de las hojas de soja	73
4.1.3.	Expresión de las ω -3 desaturadas durante el desarrollo de las hojas de soja	75
4.1.4.	Composición de ácidos grasos totales en cultivos celulares fotosintéticos de soja	78
4.1.5.	Expresión de las ω -3 desaturadas en cultivos celulares fotosintéticos de soja	80
4.1.6.	Expresión de las ω -3 desaturadas en semillas en germinación	82
4.1.7.	Análisis in silico de los promotores de las ω -3 desaturadas de soja	84
4.1.8.	Discusión	93
4.2.	LOCALIZACIÓN, ORGANIZACIÓN Y REGULACIÓN DE LAS ω -6 y ω -3 DESATURASAS PLASTIDIALES	98
4.2.1.	Fraccionamientos subcelulares de soja: cloroplastos y envueltas del cloroplasto	102
4.2.2.	Valoración de los fraccionamientos con el anticuerpo antiTic40	104
4.2.3.	Detección de GmFAD7 en fracciones subcelulares y tejidos de soja.....	106
4.2.4.	Revelado con el suero preinmune	108
4.2.5.	Revelados con anticuerpos secundarios	109
4.2.6.	Revelados con el anticuerpo inmunodeplecionado	111
4.2.7.	Clonación de los genes de las ω -3 desaturadas plastidiales (FAD7) de soja y Arabidopsis y la ω -6 desaturada plastidial (FAD6) de Arabidopsis en vectores de destino para la transformación de plantas	116
4.2.8.	Generación de líneas estables homocigóticas de Arabidopsis.....	119
4.2.9.	Microscopía confocal de las líneas estables homocigóticas generadas	120
4.2.10.	Regulación por desarrollo de los niveles de proteína	126
4.2.11.	Discusión	130
4.3.	EL ÁCIDO GRASO HEXADECATRIENOICO (16:3) COMO PRECURSOR DE LA SÍNTESIS DE JASMONATOS	133
4.3.1.	Lipasas implicadas en la liberación de los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos de membrana.....	133
4.3.2.	Reacciones de peroxidación de lípidos. Enzimas implicadas.....	135
4.3.3.	Biosíntesis de Jasmonatos en plantas. Enzimas implicadas.	139
4.3.4.	Los Arabidópsidos	144
4.3.5.	Respuestas desencadenadas por jasmonatos	145

4.3.6.	El papel del dnOPDA como fitohormona	147
4.3.7.	Mutantes de desaturasas de Arabidopsis y jasmonatos	148
4.3.8.	Análisis de los genes con expresión diferencial	150
4.3.9.	Niveles de jasmonatos en respuesta a herida.....	158
4.3.10.	Análisis de los genes comunes.....	159
4.3.11.	Experimentos de suplementación con dnOPDA	164
4.3.12.	Discusión	169
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	172
5.1.	MATERIAL BIOLÓGICO	172
5.1.1.	Cultivo de plantas en condiciones controladas.....	172
5.1.1.1.	Cultivo de plantas de soja (<i>Glycine max</i> L. Merr cv Volania)	172
5.1.1.2.	Tratamientos experimentales en plantas de soja (<i>Glycine max</i> L. Merr cv Volania)	173
5.1.1.3.	Cultivo de plantas de Arabidopsis (<i>A. thaliana</i> L. Heynh cv Columbia y mutantes derivados de ésta) 174	
5.1.1.3.1.	Esterilización y cultivo en placa	174
5.1.1.3.2.	Cultivo en maceta	176
5.1.1.3.3.	Propagación de semillas de <i>Arabidopsis</i>	177
5.1.1.3.4.	Experimentos de suplementación en Arabidopsis.....	178
5.1.2.	Cultivo líquido de suspensiones celulares de soja (<i>Glycine max</i>).....	179
5.1.3.	Fraccionamiento subcelular y purificación	180
5.1.3.1.	Aislamiento de cloroplastos intactos	180
5.1.3.2.	Aislamiento de tilacoides	182
5.1.3.3.	Aislamiento de membranas granales del fotosistema II	184
5.1.3.4.	Aislamiento de envueltas.....	185
5.2.	TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES	188
5.2.1.	Determinación de la concentración de clorofila	188
5.2.2.	Lípidos	189
5.2.2.1.	Extracción de lípidos totales y preparación de los metil-ésteres de los ácidos grasos.....	189
5.2.3.	Proteínas.....	190
5.2.3.1.	Extracción de proteínas y cuantificación	190
5.2.3.2.	Electroforesis SDS-PAGE (unidimensional).....	191
5.2.3.3.	Tinción con coomassie normal y coloidal	193
5.2.3.4.	Transferencia y detección inmunológica de proteínas.....	194
5.2.3.4.1.	Transferencia	194
5.2.3.4.2.	Detección inmunológica de proteínas	194
5.2.3.5.	Controles utilizados en la detección inmunológica de proteínas	196
5.2.3.5.1.	Suero preinmune	196
5.2.3.5.2.	Inmunodepleción (anticuerpos desde péptidos sintéticos)	196
5.2.3.5.3.	Anticuerpo secundario	197

5.2.4.	Ácidos nucleicos	198
5.2.4.1.	Extracción de RNA de tejidos vegetales, purificación y cuantificación	198
5.2.4.2.	Tratamiento DNAsa y síntesis de cDNA.....	199
5.2.4.3.	PCR semicuantitativa	200
5.2.4.4.	Análisis de los productos de PCR y cuantificación relativa	203
5.2.4.4.1.	Extracción de los productos de PCR de geles de agarosa y purificación	204
5.2.4.4.2.	Preparación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> (DH5α).....	205
5.2.4.4.3.	Transformación de células competentes de <i>Escherichia coli</i> (DH5α)	206
5.2.4.4.4.	Cultivo de células de <i>Escherichia coli</i> (DH5α).....	206
5.2.4.4.5.	Aislamiento de DNA plasmídico y digestión con enzimas de restricción	207
5.2.4.5.	Extracción de DNA genómico.....	208
5.2.4.6.	Análisis transcriptómico	209
5.2.4.6.1.	Material biológico y diseño experimental.....	209
5.2.4.6.2.	Preparación de las muestras e hibridación en las micromatrices	209
5.2.4.6.3.	La micromatriz ATH1.....	211
5.2.4.6.4.	Análisis de los datos	211
5.2.5.	Tecnología Gateway®: vectores y transformación	212
5.2.5.1.	Generación del vector de entrada (pENTR™).....	213
5.2.5.2.	Generación del vector de destino, reacción LR clonasa®	215
5.2.5.3.	Preparación de células competentes de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	218
5.2.5.4.	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	219
5.2.5.5.	Transformación de plantas de <i>Arabidopsis</i>	220
5.2.6.	Técnicas de microscopía	222
5.2.6.1.	Preparación de material fresco (microscopio confocal).....	223
5.2.6.2.	Microscopía confocal (SP2)	223
5.3.	ESTADÍSTICA	224
6.	CONCLUSIONES.....	225
7.	BIBLIOGRAFÍA	226

1. INTRODUCCIÓN

Los lípidos son un grupo estructuralmente diverso de moléculas orgánicas compuestas básicamente por carbono, hidrógeno y en menor medida oxígeno, aunque también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno. Su característica principal es su insolubilidad en agua. Existen numerosos compuestos derivados de los ácidos grasos y lípidos. Este hecho los convierte probablemente en el grupo más numeroso de estructuras químicas en la biosfera (Ohlrogge y col., 1991).

Los lípidos desempeñan numerosas e importantes funciones biológicas en las plantas, de las cuales la más evidente es la estructural, ya que los lípidos forman parte de las membranas celulares que actúan como barreras en la compartimentalización celular. Éstos también desempeñan funciones energéticas, ya que actúan como moléculas de reserva, esto ocurre de manera muy significativa en las semillas donde se acumulan como triacilgliceroles en elevadas cantidades. Además, algunos derivados de los lípidos como las ceras constituyen la primera barrera de defensa de las plantas frente a la deshidratación o al ataque por patógenos. Otros derivados de los lípidos actúan como segundos mensajeros (como el inositol-fosfato) o como precursores de hormonas vegetales (los jasmonatos), participando en la transducción de señales celulares.

1.1. LOS LÍPIDOS VEGETALES

1.1.1. LÍPIDOS SIMPLES

Además de otros lípidos simples como la carnitina, los esteroides, tocoferoles, carotenoides y otros isoprenoides a continuación se detallan los lípidos simples más comunes en plantas. Entre ellos se encuentran los ácidos grasos, las ceras, los triacilgliceroles y las oxilipinas.

1.1.1.1. Ácidos grasos

Los ácidos grasos son los lípidos más sencillos. Químicamente, son ácidos carboxílicos con cadenas carbonadas de 4 a 36 átomos de carbono que pueden presentar enlaces sencillos o múltiples (fundamentalmente enlaces dobles) y sustituciones con otros grupos funcionales como el hidroxilo o epoxi, así como ramificaciones. Los ácidos grasos más abundantes poseen de 12 a 24 átomos de carbono, y no poseen ramificaciones. Cuando existen dobles enlaces, éstos casi nunca son conjugados, dejando entre ellos un grupo metileno. La configuración de los dobles enlaces es *cis* en casi todos los ácidos grasos naturales, con la excepción del ácido graso Δ -3 *trans*-hexadecénico (16:3t) sintetizado en los cloroplastos (Somerville y col., 2000a). Los ácidos grasos de cadena corta (12 átomos de carbono) se acumulan solamente en algunos tejidos de ciertas especies, como las semillas de coco y palma (Carlsson, 2009). Los de cadena media (16-18 átomos de carbono) son los más abundantes, y se acumulan en diferentes proporciones en las diferentes clases de lípidos que componen la célula vegetal (Slack y Roughan, 1975 ; Burgos y col., 2011). De ellos, el ácido linoleico (18:2 Δ 9,12) y el ácido linolénico (18:3 Δ 9,12,15) son los ácidos grasos mayoritarios (Burgos y col., 2011). Finalmente, los de cadena larga se encuentran habitualmente en los lípidos extracloroplásticos PS, PE o PC (Burgos y col., 2011). Éstos también suelen presentar modificaciones con grupos hidroxilo o epoxi, y forman parte de cutinas o ceras que recubren la superficie vegetal (Samuels y col., 2008). Los principales ácidos grasos encontrados en plantas se detallan en la tabla 1.1.

Nombre común	Fórmula molecular	Abreviatura
Ácido laúrico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	12:0
Ácido palmítico ^b	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	16:0
Ácido esteárico ^b	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	18:0
Ácido araquidónico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	20:0
Ácido behénico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	22:0
Ácido lignocérico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	24:0
Ácido oleico ^b	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:1 Δ^9
Ácido petroselénico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	18:1 Δ^6
Ácido linoleico ^b	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:2 $\Delta^{9,12}$
Ácido α -linolénico ^b	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18:3 $\Delta^{9,12,15}$
Ácido γ -linolénico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	18:3 $\Delta^{6,12,15}$
Ácido ruginico	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$	18:3 $\Delta^{7,12,15}$
Ácido erúico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	22:1 Δ^{13}

Tabla 1.1 Principales ácidos grasos saturados (sobre fondo verde) e insaturados (sobre fondo marrón) presentes en las plantas. (b) Ácidos grasos encontrados más frecuentemente en los lípidos de membrana. Adaptada de Somerville y col., (2000a).

1.1.1.2. Ceras

Las ceras están compuestas por ésteres de alcoholes de cadena larga con ácidos grasos, que se embeben en una red de cutina y la recubren, dando forma a la cutícula (Pulsifer y col., 2012). Ésta es sintetizada en las células de la epidermis (Samuels y col., 2008) y juega un papel importante en la interacción y adaptación de las plantas al ambiente porque confiere resistencia a la desecación, además es la primera barrera de las plantas frente a los patógenos (Beisson y col., 2012). La suberina (poliéster) es otro compuesto derivado de los lípidos y su forma más conocida es el corcho. Se deposita en la cara interna de la pared celular a lo largo del desarrollo de la planta (en raíces y tallos) y en determinadas condiciones de

estrés (Beisson y col., 2012). Los tejidos con suberina, como la raíz, participan en la resistencia a patógenos, la hidratación y la nutrición mineral. Además de éstos, se han identificado en plantas otros polímeros similares, como la esporopolenina que recubre los granos de polen (Chen y col., 2011) y el cután (poli-hidrocarburo similar a la cutina), pero están mucho menos caracterizados (Villena y col., 1999).

1.1.1.3. Triacilgliceroles

En las semillas, los lípidos pueden llegar a suponer el mayor almacén de carbono, conteniendo hasta un 60 % del peso seco (Ohlrogge y Browse, 1995). Los lípidos mayoritarios en este tejido son los triacilgliceroles (TAG), los cuales poseen tres moléculas de ácido graso esterificadas al glicerol, cada una en un átomo de carbono. Los triacilgliceroles (TAG) se denominan lípidos neutros porque carecen de zona polar (Somerville y col., 2000a) y actúan principalmente como moléculas de reserva energética en determinados momentos del desarrollo vegetal, suponiendo hasta un 25 % del aporte energético en la alimentación humana en países desarrollados (Chapman y Ohlrogge, 2012).

1.1.1.4. Oxilipinas

Las oxilipinas son productos de oxidación de los ácidos grasos, entre los que se encuentra el ácido jasmónico, sus intermedios de síntesis y sus derivados. Mientras los lípidos más abundantes en plantas tienen función estructural o de reserva energética, otros ejercen una función como moléculas señalizadoras, como las oxilipinas. Una de las principales características de éstos es que se acumulan en baja cantidad en condiciones control y su síntesis se incrementa en determinadas condiciones de estrés (Testerink y Munnik, 2011) en respuesta a estímulos ambientales o endógenos. Su producción permite desencadenar cascadas de señalización que dan lugar a eventos celulares y respuestas fisiológicas. Los ácidos

grasos se transforman en oxilipinas en las células vegetales a través de una serie de reacciones que se llevan a cabo gracias a la coordinación de varios orgánulos, éstas son responsables de fenómenos como la elongación de la raíz, o la maduración del polen (McConn y Browse, 1996). Además, las oxilipinas pueden sustituir a los ácidos grasos en los glicerolípidos, formando los compuestos denominados Arabidópsidos (Andersson y col., 2006 ; Kourtchenko y col., 2007 ; Glauser y col., 2008 ; Glauser y col., 2009) que poseen efecto hormonal *per se*. Las oxilipinas se tratarán con mayor profundidad en el capítulo 4.3 de resultados “La oxilipina dnOPDA como fitohormona precursora del ácido jasmónico”.

1.1.2. LÍPIDOS COMPLEJOS

1.1.2.1. Esfingolípidos

Los esfingolípidos componen un amplio grupo de estructuras moleculares en las que los ácidos grasos están unidos mediante un enlace amida a la esfingosina, y su forma más sencilla es la ceramida. Los esfingolípidos, que suponen menos del 5 % de los lípidos totales, se encuentran principalmente en la membrana plasmática celular (Somerville y col., 2000a). En ésta membrana pueden llegar a suponer más de un 40 % de los lípidos que la componen (Sperling y col., 2005). Las especies mayoritarias de esfingolípidos en plantas son los cerebrósidos (glucosilceramidas) y sus derivados más complejos. Éstos se encuentran en todas las membranas celulares excepto la plastidial y la mitocondrial (Sperling y col., 2005) y se relacionan con resistencia de las plantas al estrés oxidativo o al estrés por calor (Van Brocklyn y Williams, 2012). Su cuantificación ha sido frecuentemente subestimada debido a que se localizan en zonas resistentes a la acción de detergentes en la membrana plasmática, que podrían representar las unidades de

organización denominadas balsas lipídicas (Mongrand y col., 2004 ; Sperling y col., 2005).

1.1.2.2. *Cardiolipina*

La cardiolipina es un lípido complejo que consta de dos unidades de fosfatidilglicerol (PG) unidas a través de una tercera molécula de glicerol, por eso es también denominada difosfatidilglicerol. En plantas también se ha detectado la presencia de cardiolipina. Del mismo modo que en animales su localización en las células vegetales parece restringirse a las membranas mitocondriales. En éstas puede llegar a suponer hasta un 30 % de los lípidos que componen sus membranas (Darwish y col., 2009). Se ha descrito el descenso de sus niveles en hojas sometidas a estrés salino aunque su función biológica no está todavía aclarada (Darwish y col., 2009).

1.1.2.3. *Glicerolípidos*

Los glicerolípidos constituyen el grupo más abundante de lípidos presentes en las membranas vegetales. Las membranas son las barreras naturales entre células y también entre orgánulos subcelulares. En una célula se producen simultáneamente reacciones de carácter anabólico (de síntesis) y catabólico (de degradación). La diferente compartimentalización de éstas es vital para el funcionamiento celular global. A su vez, existen numerosas reacciones que se desarrollan en el interior de las membranas, como por ejemplo las que tienen lugar durante la fotosíntesis (captación de la luz solar y transferencia electrónica). Las membranas son también el entorno natural de las proteínas de membrana, que realizan funciones básicas para la célula vegetal. Desde un punto de vista fisiológico, la existencia de las membranas biológicas permite la formación del gradiente de protones clave para el mantenimiento de la bioenergética celular

(Peter, 1961; 1979), y determina los fenómenos de homeostasis iónica, de gran importancia a nivel celular.

La estructura de los glicerolípidos se basa en un esqueleto de glicerol con dos ácidos grasos esterificados en las posiciones sn-1 y sn-2 (ver figura 1.1). Además, en la posición sn-3 tienen unido un tercer grupo de carácter polar, cuya identidad genera la variedad de glicerolípidos vegetales. La presencia en la misma molécula de una zona polar y otra apolar les aporta carácter anfipático y ésta propiedad les permite formar las bicapas celulares. Las principales clases de glicerolípidos que forman las membranas vegetales son los fosfolípidos, los galactolípidos y los sulfolípidos, dependiendo de si el sustituyente en posición sn-3 es un fosfato, una o varias moléculas de galactosa o una unidad de sulfoquinovosa, respectivamente. La estructura de los glicerolípidos y la naturaleza de sus sustituyentes están indicadas en la figura 1.1. Los galactolípidos y sulfolípidos se encuentran principalmente en las membranas de los cloroplastos, y los fosfolípidos en las membranas extraplastidiales (Somerville y col., 2000a). En determinadas condiciones de estrés, como la deficiencia de fosfato, algunos galactolípidos son capaces de sustituir a los fosfolípidos en las membranas extraplastidiales (Nakamura, 2013).

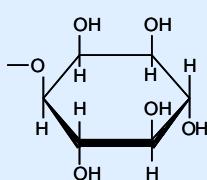
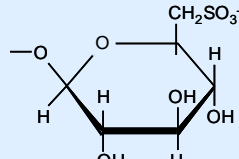
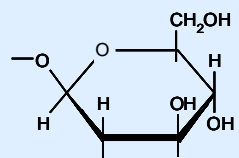
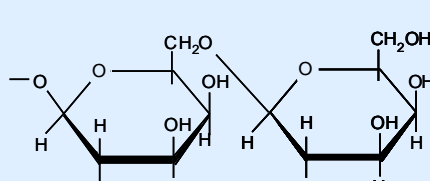
<p>Glicerofosfolípido (estructura general)</p> <div> $\begin{array}{c} \text{sn-1 } \text{CH}_2 - \text{O} - \text{C}(=\text{O}) - \text{C}_{15}\text{H}_{31} \\ \\ \text{sn-2 } \text{CH} - \text{O} - \text{C}(=\text{O}) - \text{C}_{17}\text{H}_{33} \\ \\ \text{sn-3 } \text{CH}_2 - \text{Y} - \text{X} \end{array}$ <p>Ácido graso saturado Ácido graso insaturado</p> </div>			
Fórmula de Y	Nombre de X- OH	Fórmula de X	Nombre del lípido
$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{O} - \text{P} - \text{O} \\ \\ \text{O}^- \end{array} $	Agua	-H	Ácido fosfatídico (PA)
	Colina	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Fosfatidilcolina (PC)
	Etanolamina	$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$	Fosfatidiletanolamina (PE)
	Glicerol	$-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$	Fosfatidilglicerol (PG)
	Serina	$ \begin{array}{c} \text{NH}_3^+ \\ \\ -\text{CH}_2 - \text{CH} \\ \\ \text{COO}^- \end{array} $	Fosfatidilserina (PS)
	Fosfatidilglicerol	$ \begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \quad \text{O} \\ \quad \quad \\ -\text{CH}_2\text{CHOH} - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{P} - \text{O} - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{C}(=\text{O}) - \text{CH}_2 - \text{O} - \text{C}(=\text{O}) - \text{R} \end{array} $	Difosfatidilglicerol (cardiolipina)
Sin grupo Y	mio-Inositol		Fosfatidilinositol (PI)
	Sulfoquinovosa		Sulfoquinovosildiacilglicerol O sulfolípido (SL)
	Galactosa		Monogalactosildiacilglicerol (MGDG)
	Digalactosa		Digalactosildiacilglicerol (DGDG)

Figura 1.1 Estructura de las principales clases de glicerolípidos de membrana. Adaptada de Somerville y col., (2000a).

La regulación de la síntesis de ácidos grasos y glicerolípidos, y del mantenimiento de las propiedades de las membranas (fluidez, composición

lipídica...) es muy importante para el correcto desarrollo celular. La diversidad de clases de lípidos y la conservación de su proporción en cada tipo de membrana a lo largo del reino vegetal hace pensar que éstas diferencias son importantes para la función de cada membrana (Ohlrogge y col., 1991 ; Moreau y col., 1998). De éste modo, el estudio de las rutas de síntesis y los mecanismos de regulación de las mismas es de gran interés en el campo de la biología vegetal.

Al ser objeto principal de ésta Tesis Doctoral, se tratará en profundidad la función de los lípidos de membrana mayoritarios (fosfolípidos, glucolípidos y sulfolípidos) así como sus rutas de biosíntesis. El en apartado posterior “Situación actual y retos” de ésta Tesis Doctoral se tratarán las principales aplicaciones de los lípidos vegetales. En cada capítulo de resultados y discusión se expondrá una breve introducción específica del tema.

1.1.3. CLASES DE GLICEROLÍPIDOS VEGETALES

1.1.3.1. Galactolípidos

La diferencia fundamental en la composición lipídica de las membranas vegetales respecto a las de animales y hongos, es la presencia de los galactolípidos (Somerville and Browse, 1991). Los principales galactolípidos son el monogalactosil-diacilglicerol (MGDG), el digalactosil-diacilglicerol (DGDG) y el sulfoquinovosil-diacilglicerol (SQDG). Los galactolípidos pueden llegar a representar un 50% de los lípidos en hojas (Benning y Ohta, 2005) y un 75% de los lípidos cloroplásticos (Dörmann y Benning, 2002). De ellos, los más abundantes son el MGDG y el DGDG.

Un galactolípidos consta de dos ácidos grasos esterificados al glicerol en posiciones sn-1 y sn-2. En posición sn-3 se encuentran covalentemente unidas una

o dos moléculas de galactosa dando lugar a los principales tipos de galactolípidos (ver figura 1.1). Se ha descrito también la presencia de otros compuestos derivados de éstos galactolípidos, como el trigalactosil-diacilglicerol (TGDG) y el tetragalactosil-diacilglicerol. Éstos se han detectado *in vivo* en determinadas circunstancias, como por ejemplo en los mutantes *tgd* de *Arabidopsis* (Xu y col., 2003 ; Roston y col., 2012 ; Wang y col., 2012). Los galactolípidos poseen en su mayoría ácidos grasos con altos niveles de insaturación. En ellos, el ácido α -linolénico (18:3 $\Delta^{9,12,15}$) puede llegar a constituir hasta un 90 % de los ácidos grasos que los componen (Somerville y col., 2000a).

La construcción de las membranas tilacoidales a través de galactolípidos permite a las plantas sintetizarlas de un modo independiente a la incorporación de fósforo (Frentzen, 2004). Esto supone una ventaja adaptativa ya que el fósforo es un macronutriente vegetal limitante en el crecimiento de las plantas (Raghothama, 1999). Aunque la presencia de la mayoría de galactolípidos se restringe a las membranas tilacoidales, es cada vez más aparente que, al menos el DGDG, se encuentra también en las membranas extraplastidiales en tejidos no fotosintéticos y en condiciones de deficiencia de fósforo (Dörmann y Benning, 2002 ; Benning y Ohta, 2005).

Al ser inusuales en otros tipos de membranas, la elevada abundancia de estos lípidos en las membranas tilacoidales se ha relacionado siempre con la actividad fotosintética llevada a cabo en éstas. Sin embargo, hasta hace pocos años, se desconocía si su función se limitaba a rodear a los complejos fotosintéticos o formaban parte de la estructura de los mismos. El aislamiento de los mutantes *mgd1* (Jarvis y col., 2000) y *dgd1* (Dörmann y col., 1995), deficientes en la síntesis de MDGD y DGDG respectivamente, la caracterización de sus alteraciones en la ultraestructura del cloroplasto y en su capacidad fotosintética, indicaba un papel más relevante más allá de la mera función estructural en las membranas. La

posterior cristalización del fotosistema I (PSI) reveló que cada monómero de PSI contiene tres moléculas de PG y una de MGDG (Jones, 2007). En el caso del fotosistema II (PSII), su cristalización reveló que en su estructura, se englobaban hasta 25 moléculas de lípido (11 de MGDG, 7 de DGDG, 5 de SQDG y 2 de PG) (Guskov y col., 2009). Todos estos lípidos establecen interacciones (principalmente mediante puentes de hidrógeno) con diversas subunidades de los complejos fotosintéticos. En el trabajo de Holzl y col., (2006) la sustitución de la actividad galactosil-transferasa en el mutante *dgd1* (deficiente en galactolípidos) por la actividad glucosil-transferasa provocaba la acumulación de glucolípidos en los tilacoides, eliminando los problemas de crecimiento encontrados en este mutante. Sin embargo, esta sustitución sólo conseguía restaurar parcialmente las deficiencias fotosintéticas descritas para el mutante *dgd1*. Estos hallazgos sugieren que los galactolípidos establecen interacciones con los complejos fotosintéticos a través de su grupo sustituyente. Además éstos estudios revelan que su presencia en las membranas tilacoidales es necesaria para la máxima eficiencia fotosintética en plantas (Holzl y col., 2006). Se han intentado obtener mutantes de *Arabidopsis* que no sintetizen ningún galactolípidos, como el doble mutante *tgdl1-1/ats1*, sin embargo no ha sido posible obtener semillas viables de éste genotipo (Xu y col., 2005). Esto sugiere que los galactolípidos son necesarios para la viabilidad vegetal, incluso durante el desarrollo de la semilla (Xu y col., 2005).

En plantas, sólo se ha detectado la presencia de un tipo de sulfolípidos. Éste es el sulfoquinovosil-diacilglicerol (SQDG) y su estructura es muy similar a la del MGDG, pero posee además un grupo sulfurado unido al carbono 6 de la galactosa (ver figura 1.1) (Somerville y col., 2000a). La presencia de SQDG está restringida al cloroplasto y se acumula en bajas cantidades en condiciones normales de crecimiento (aproximadamente un 5 %). Se han encontrado moléculas de SQDG rodeando al fotosistema II (Jones, 2007). Además, éste sulfolípidos es indispensable

en determinadas situaciones de estrés como la deficiencia de fosfato (Shimajima, 2011). Bajo esta condición, la cantidad de SQDG aumenta considerablemente (como también lo hace el DGDG). El aumento de SQDG parece destinado a sustituir parcialmente la función del fosfatidilglicerol (PG) plastidial (Nakamura, 2013). Esto se debe a que ambos tienen carácter aniónico. La presencia de lípidos con carácter aniónico en los tilacoides se encuentra directamente relacionada con la capacidad fotosintética de los mismos (Yu y Benning, 2003).

1.1.3.2. Fosfolípidos

Son glicerolípidos en los cuales el grupo polar está unido a través de un grupo fosfato en la posición sn-3. El origen de éste grupo polar permite diferenciar los tipos de fosfolípidos: ácido fosfatídico (PA), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI) y (ver figura 1.1). De todos ellos, PC y PE son los fosfolípidos vegetales más abundantes, y juntos representan aproximadamente el 50 % de los glicerolípidos extraplastidiales. Tanto el PA, como el PG y la PC se pueden encontrar en las membranas plastidiales y en las extraplastidiales (Browse y col., 1986b ; Dorne y Heinz, 1989 ; Moreau y col., 1998 ; Andersson y col., 2001). El resto de fosfolípidos están presentes exclusivamente en las membranas extraplastidiales.

Cada vez se relacionan de manera más evidente los fosfolípidos con la señalización celular. Los eventos de señalización celular suelen desencadenarse tras la identificación de una señal por un receptor que habitualmente es una proteína de membrana. La activación de estos receptores se suele traducir, directa o indirectamente, en la actividad de determinadas enzimas (fosfolipasas o kinasas) que convierten a los fosfolípidos en segundos mensajeros, actuando éstos como moléculas señalizadoras (Meijer y Munnik, 2003).

El ácido fosfatídico (PA) es una molécula intermediaria en la síntesis de glicerolípidos que se puede producir tanto en el cloroplasto como en el retículo endoplásmico. Además, el PA es un componente más del mecanismo molecular que provoca el cierre estomático como respuesta de las plantas a la sequía y a la salinidad (Hong y col., 2010), y actúa como molécula señalizadora junto al ácido abscísico (ABA). Los niveles de PA en la mayoría de tejidos no superan el 1 %, sin embargo, éstos cambian rápidamente en diferentes condiciones. La magnitud del cambio es variable dependiendo del tratamiento y del tejido en cuestión (Hong y col., 2010). Por ejemplo, se ha descrito la acumulación de PA durante el desarrollo de tejidos como la raíz o el tubo polínico y también en procesos como la aclimatación al frío o el estrés por patógenos (Testerink y Munnik, 2011).

El fosfatidilglicerol (PG) es un fosfolípido aniónico presente en todos los tipos de membrana y siempre se encuentra en bajas cantidades. Su síntesis se lleva a cabo en la envuelta interna cloroplástica, en la membrana interna mitocondrial y en el retículo endoplásmico (Frentzen, 2004). El PG plastidial se encuentra formando parte de las membranas tilacoidales (Moreau y col., 1998) en las cuales establece interacciones con los complejos fotosintéticos (Jones, 2007). Su presencia en los tilacoides es esencial para la función fotosintética (Sato y col., 2000 ; Jones, 2007 ; Guskov y col., 2009). El PG plastidial contiene el único ácido graso de configuración trans; Δ -9 trans-hexadecénico (16:1t) en posición sn-2 (Dubacq y Tremolieres, 1983 ; Dörmann, 2005).

La fosfatidilcolina (PC) es el fosfolípido más abundante en las membranas vegetales (Somerville y col., 2000a). Su presencia está vinculada al retículo endoplásmico y a la envuelta externa del cloroplasto. Sin embargo también se ha detectado PC en las membranas tilacoidales de determinadas especies (Andersson y col., 2001). Su principal función es la constitución de las membranas extraplastidiales, aunque también podría estar relacionada con la remodelación de

los fosfolípidos de membrana, o el intercambio de lípidos entre membranas a través de su derivado lyso-fosfatidilcolina (lyso-PC) (Kazachkov y col., 2008).

La fosfatidiletanolamina (PE) es un lípido minoritario en plantas. Habitualmente representa alrededor de un 2 % de los lípidos totales (Coulon y col., 2012) y a partir de él se sintetizan derivados N-acilados que sirven como moléculas señalizadoras en la célula vegetal. Estos derivados se encuentran en altas cantidades en las semillas y se han relacionado con la respuesta de éstas a la germinación, al desarrollo de la raíz o a la senescencia floral (Kilaru y col., 2007 ; Coulon y col., 2012).

La fosfatidilserina (PS) es un lípido que representa menos del 1 % de los glicerolípidos en plantas y se ha localizado principalmente en la membrana plasmática (Moreau y col., 1998). Su papel fisiológico no ha sido descrito con precisión. Sin embargo en un trabajo reciente se ha descrito su acumulación en tejidos no fotosintéticos, especialmente flores (Yamaoka y col., 2011). En este trabajo también se ha descrito que la presencia de PS es imprescindible para el correcto desarrollo del polen (Yamaoka y col., 2011).

El fosfatidilinositol (PI), está presente en muy baja proporción en las membranas extracloroplásticas (<1 %). Sin embargo, tiene un papel muy importante en la señalización derivada de lípidos ya que es la molécula a partir de la cual se sintetizan los segundos mensajeros como el IP3 ó el IP6 (Meijer y Munnik, 2003 ; Heilmann, 2009). Ambas formas de inositol-fosfato se han relacionado con la liberación de calcio en las células vegetales y el estrés osmótico (Meijer y Munnik, 2003 ; Heilmann, 2009).

Además de los galactolípidos, sulfolípidos y fosfolípidos existen otros glicerolípidos adicionales en plantas, estos son el diacilglicerol (DAG) y uno de sus derivados, descrito anteriormente en el apartado 1.1.1.6, el triacilglicerol (TAG). El DAG, está compuesto por dos moléculas de ácido graso esterificadas en posición

sn-1 y sn-2 del glicerol. En ésta molécula, el grupo fosfato en posición sn-3 del PA es eliminado por fosfatasas específicas (Ohlrogge y Browse, 1995 ; Dubots y col., 2012). El DAG es un intermediario central en las rutas de síntesis de glicerolípidos. Aunque se ha descrito que es una molécula señalizadora en animales, esta función en plantas no ha sido confirmada (Meijer y Munnik, 2003 ; Testerink y Munnik, 2011).

1.2. SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS EN PLANTAS

La síntesis *de novo* de ácidos grasos en plantas comienza en el plastidio tanto en hojas como en semillas en desarrollo (Weaire y Kekwick, 1975 ; Ohlrogge y col., 1979 ; Harwood, 1988 ; Somerville y Browse, 1991). Este proceso se lleva a cabo gracias a la acción de la enzima Acetil-CoA Carboxilasa (ACCase) y a la de un complejo enzimático denominado Ácido Graso Sintasa (FAS) a través de una serie de reacciones de condensación. Este proceso requiere de un donador de átomos de carbono (el acetil-CoA) y un donador de poder reductor (el NADPH). Las reacciones implicadas en la síntesis se indican en la figura 1.2.

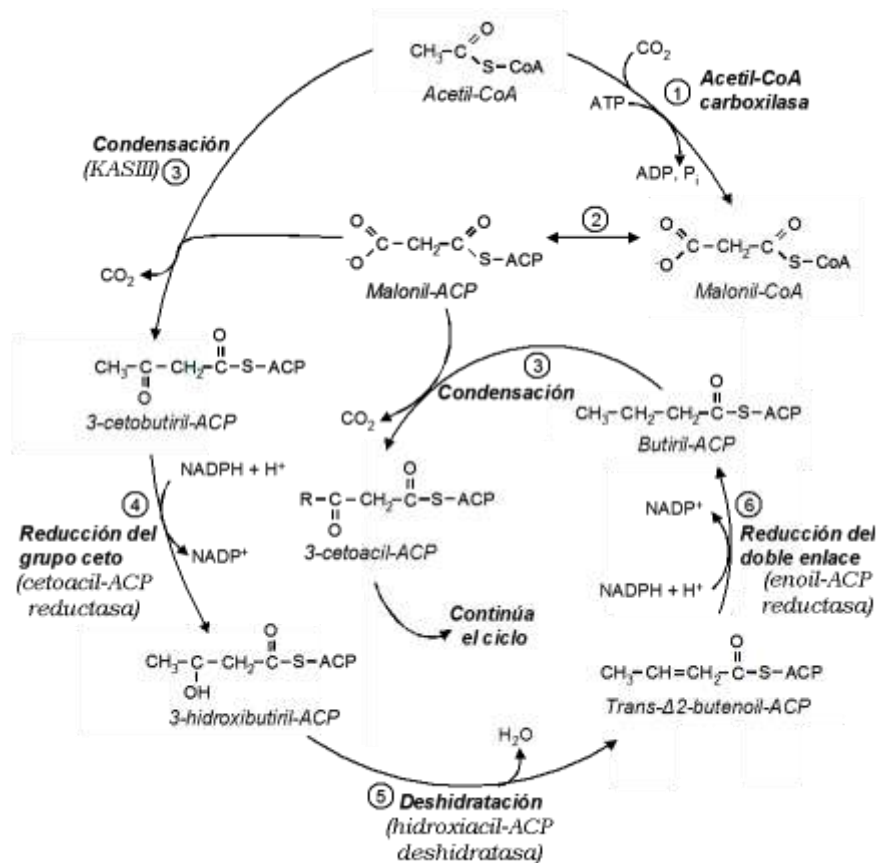


Figura 1.2 Reacciones implicadas en la ruta de síntesis de ácidos grasos en plantas.

Adaptada de Ohlrogge y Browse, (1995).

La enzima acetil-CoA carboxilasa se encarga de sintetizar malonil-CoA mediante la carboxilación de una molécula de acetil-CoA. En hojas se ha descrito que este paso está limitado por la luz (Postbeittenmiller y col., 1991).

El complejo ácido graso sintasa se encarga de sintetizar la cadena hidrocarbonada, mediante la adición sucesiva de dos unidades de carbono cedidas por moléculas de malonil-CoA. La primera subunidad del complejo ácido graso sintasa en intervenir es la enzima malonil-CoA:ACP transacilasa que se encarga de unir el grupo malonilo a otra proteína del complejo denominada proteína transportadora de acilos (ACP) a la que el ácido graso va a estar unido durante su

elongación hasta 16 ó 18 átomos de carbono. Seguidamente, otra enzima denominada β -cetoacyl sintasa III (KASIII) condensa una molécula de acetil-CoA al grupo malonilo, sufriendo éste una descarboxilación. Así se forma un intermedio de 4 carbonos de longitud (Ohlrogge y col., 1991). El intermedio de síntesis cetoacyl-ACP formado en cada ciclo sufre una reducción (generando el intermedio de reacción hidroxilacyl-ACP), una deshidratación (generando transenoil-ACP) y de nuevo otra reducción (que genera acil-ACP). Estas reacciones se llevan a cabo por medio de las enzimas cetoacyl-ACP reductasa, hidroxilacyl-ACP deshidratasa y enoil-ACP reductasa, respectivamente. De éste modo, en cada ciclo de reacciones, la cadena carbonada se alarga dos átomos de carbono. Las enzimas KASI y KASII, (del mismo tipo que KASIII) participan en la elongación de la cadena carbonada del ácido graso. KASI produce ácidos grasos de 6 a 16 átomos de carbono y KASII se encarga de una condensación adicional que da lugar al ácido esteárico (18:0) (Somerville y col., 2000a). El complejo FAS sintetiza normalmente ácido palmítico (16:0) y ácido esteárico (18:0). La síntesis de ácidos grasos de cadena más larga requiere la participación de enzimas elongasas de ácidos grasos (FAE) localizadas en el citosol (Somerville y Browse, 1991). El 18:0 es generalmente desaturado hasta 18:1 por la acción de la única desaturasa soluble conocida, FAB2 (McKeon y Stumpf, 1982). Tanto 16:0 como 18:1 se incorporan a las rutas de síntesis de lípidos que se describirán a continuación.

Además de la regulación de éste proceso en respuesta a las demandas celulares, durante los años 80 se describió la fluctuación del contenido en ácidos grasos vegetales a lo largo de los periodos de luz y oscuridad en hojas de espinaca. El ácido graso 18:1 aumentaba en el ciclo de luz y el 18:3 en el de oscuridad (Browse y col., 1981). En éste trabajo se explicó que la síntesis de ácidos grasos está prácticamente detenida en periodos de oscuridad (Roughan y col., 1980), mientras que la desaturación de los ácidos grasos sigue en funcionamiento durante

este periodo (Browse y col., 1981). Esto se comprobó en trabajos posteriores en la planta modelo *Arabidopsis* (Ekman y col., 2007 ; Burgos y col., 2011 ; Maatta y col., 2012).

1.3. SÍNTESIS DE LÍPIDOS DE MEMBRANA EN PLANTAS

1.3.1. DOS RUTAS DE SÍNTESIS

La síntesis de glicerolípidos en plantas tiene lugar principalmente en dos orgánulos (el cloroplasto y el retículo endoplásmico). También se ha descrito la síntesis de PA, y su transformación a PG mediante enzimas localizadas en la envuelta interna de la mitocondria (Moreau y col., 1998). La producción de glicerolípidos en plantas tiene lugar a través de dos rutas, la procariota (denominada así por su analogía con la que opera en organismos procariotas) y la eucariota (por contraposición a la anterior). La existencia de las dos rutas de síntesis de glicerolípidos se apoya en un gran número de evidencias experimentales. Los primeros resultados se obtuvieron mediante el marcaje con elementos radiactivos ($[^{14}\text{C}]$ -acetato, $^{14}\text{CO}_2$, $[^3\text{H}]$ -glicerol y $[^{14}\text{C}]$ -ácido oleico) en hojas y algas *in vivo* (Nichols, 1968 ; Appleby y col., 1971 ; Slack y Roughan, 1975 ; Siebertz y Heinz, 1977 ; Slack y col., 1977 ; Ohnishi y Yamada, 1980 ; Gardiner y col., 1982 ; Williams y Khan, 1982). También se realizaron experimentos de marcaje sobre fracciones aisladas de cloroplastos y microsomas (Roughan y col., 1980 ; Dubacq y Tremolieres, 1983 ; Gardiner y col., 1984). Y también se hicieron experimentos con estudios enzimáticos (Joyard y Douce, 1977 ; Block y col., 1983a). Las evidencias de la existencia del modelo de dos rutas han sido ampliamente revisadas (Roughan y Slack, 1982 ; Somerville y Browse, 1991 ; Ohlrogge y Browse, 1995 ; Wallis y Browse, 2002). En el caso de los cloroplastos, la mayoría de las enzimas y

actividades enzimáticas responsables de la síntesis de lípidos se han localizado en las envueltas (Block y col., 1983a ; Froehlich y col., 2001a ; Shimojima, 2011). Como se verá a continuación, los glicerolípidos MGDG, DGDG, SQDG, PA y PG se pueden sintetizar a través de ambas rutas, mientras que PC, PE, PS y PI se sintetizan a partir de la ruta eucariota.

1.3.1.1. La ruta procariota

En la ruta procariota, los ácidos grasos sintetizados *de novo* en el cloroplasto se incorporan al esqueleto de glicerol y forman los diferentes glicerolípidos cloroplásticos sin abandonar el orgánulo durante el proceso (Roughan y col., 1980 ; Sparace y Mudd, 1982 ; Heinz y Roughan, 1983). En la figura 1.3 se muestra un esquema de las reacciones que se producen en la ruta procariota.

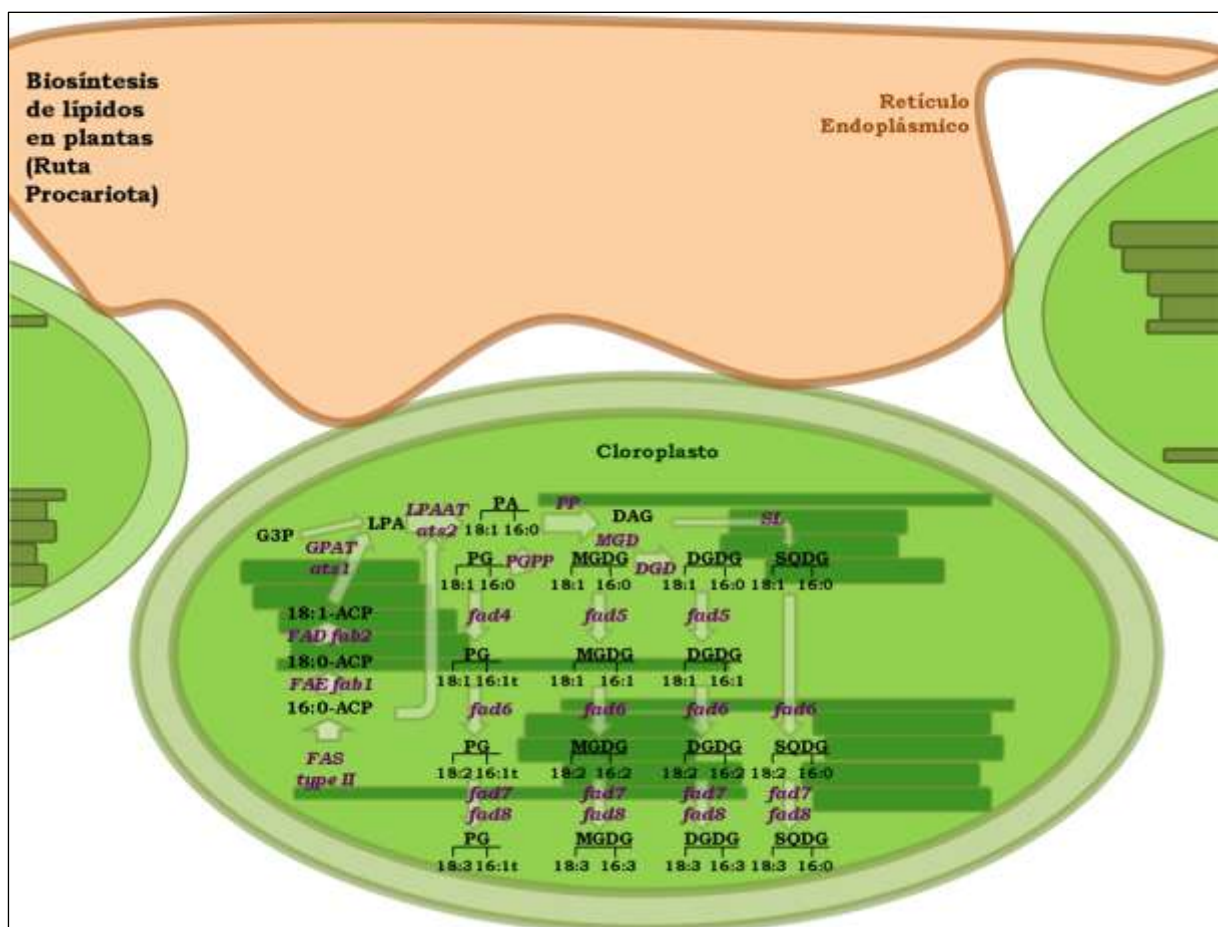


Figura 1.3. Ruta procariota de síntesis de glicerolípidos en plantas.

En esta ruta participan las enzimas glicerol-3-fosfato aciltransferasa (ATS1) y 1-acilglicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT), localizadas en la envuelta interna del cloroplasto (Li Beisson y col., 2010) las cuales se encargan de incorporar sucesivamente dos ácidos grasos al esqueleto de glicerol dando lugar al ácido fosfatídico (PA). El PA puede ser posteriormente transformado a fosfatidilglicerol (PG) o a diacilglicerol (DAG). La transformación a DAG la realiza una fosfatidato fosfatasa (PP) localizada en la envuelta interna del cloroplasto (Ohlrogge y col., 1991). El DAG se puede transformar a su vez en MGDG o en SQDG. El DGDG se sintetiza desde el MGDG bien por galactosilación del MGDG (con UDP-Galactosa) o por transferencia directa de galactosa entre dos moléculas de MGDG (Vanbesouw y Wintermans, 1978 ; Siebertz y col., 1980). Las enzimas que producen MGDG, DGDG o SQDG son, MGDG, DGDG o SQDG sintasas respectivamente, y utilizan UDP-galactosa ó UPD-sulfoquinovosa para su síntesis. Estas enzimas, que pertenecen a familias multigénicas, se han localizado también en las envueltas del cloroplasto (Froehlich y col., 2001a ; Xu y col., 2005 ; Benning, 2008). La transferencia directa de unidades de galactosa entre galactolípidos la realiza una galactolípido-galactolípido galactosil-transferasa (Benning y Ohta, 2005), la cual se relaciona también con la síntesis de derivados galactosilados del DGDG, el trigalactosil-diacilglicerol y el tetragalactosil-diacilglicerol.

En una hoja de *Arabidopsis*, aproximadamente un tercio del fósforo se encuentra formando parte de los fosfolípidos. Como se ha visto en el apartado 1.1.3.1, en condiciones de deficiencia de fosfato el DGDG es exportado a las membranas extraplastidiales (plasmática, mitocondrial y tonoplasto). De este modo se evita el consumo de fosfato destinado a la síntesis de lípidos de membrana (fosfolípidos extraplastidiales) (Shimajima, 2011). La síntesis de DGDG en condiciones de deficiencia de fosfato parece provenir de la actividad de enzimas

diferentes (MGD2, MGD3 y DGD2) a las que actúan en condiciones control (MGD1 y DGD1) (Benning y Ohta, 2005). Se ha observado que a pesar de tener la misma función, no son intercambiables. Concretamente, se ha descrito que la enzima MGD1 es capaz de funcionar con igual eficiencia sobre DAG procariota y eucariota, mientras que MGD2 y MGD3 tienen preferencia como sustrato por el diacilglicerol (DAG) proveniente de la ruta eucariota (Benning y Ohta, 2005).

Los ácidos grasos que forman parte de los glicerolípidos sintetizados a través de la ruta procariota son desaturados una vez que están esterificados al glicerol fundamentalmente debido a la acción de las desaturasas plastidiales.

1.3.1.2. *La ruta eucariota*

En la ruta eucariota los ácidos grasos sintetizados *de novo* en el cloroplasto abandonan el orgánulo en forma de derivados de acil-CoA debido a la acción de una enzima tioesterasa. Estos ácidos grasos son transportados principalmente hasta el retículo (Slack y Roughan, 1975 ; Slack y col., 1976 ; Simpson y Williams, 1979 ; Dubacq y Tremolieres, 1983) a través de un mecanismo molecular que a día de hoy es en su mayoría desconocido. En la figura 1.4 se muestra un esquema de las reacciones que se dan en la ruta eucariota.

desplaza la etanolamina (Yamaoka y col., 2011), y la reacción contraria ocurre mediante una descarboxilación de la serina (Nerlich y col., 2007).

Por otro lado, a través de la ruta eucariota también se sintetizan galactolípidos. Algunas especies lipídicas que se sintetizan en el retículo posteriormente retornan al cloroplasto transformándose en galactolípidos y sulfolípidos, pero su naturaleza todavía no está totalmente aclarada, aunque se han descrito varias posibilidades (Li Beisson y col., 2010). Una de las posibilidades es que la molécula precursora del DAG cloroplástico penetre a través de las proteínas TGD. Esta molécula podría ser el PA, ya que se ha descrito que la proteína TGD4 une PA de manera específica (Wang y col., 2012). Otra posibilidad es que sea PC la molécula que se transporta del retículo al cloroplasto. Para ser transformada en DAG cloroplástico, la molécula de PC debe ser defosforilada por una fosfolipasa C no específica (nsPLC) o bien por la acción consecutiva de una fosfolipasa D y una fosfatidato fosfatasa (Li Beisson y col., 2010).

De ésta forma, dependiendo de si los ácidos grasos sintetizados en el cloroplasto son liberados de la proteína ACP por una aciltransferasa (forman ácido lisofosfatídico, LPA) o por una tioesterasa (forman acil-CoA), serán incluidos en la ruta procariota o en la eucariota, respectivamente (Ohlrogge y col., 1991). Desde este punto de vista, existen dos tipos de plantas, las denominadas 16:3 y las 18:3. En la figura 1.5 se muestra un esquema de las dos rutas de síntesis de glicerolípidos en plantas.

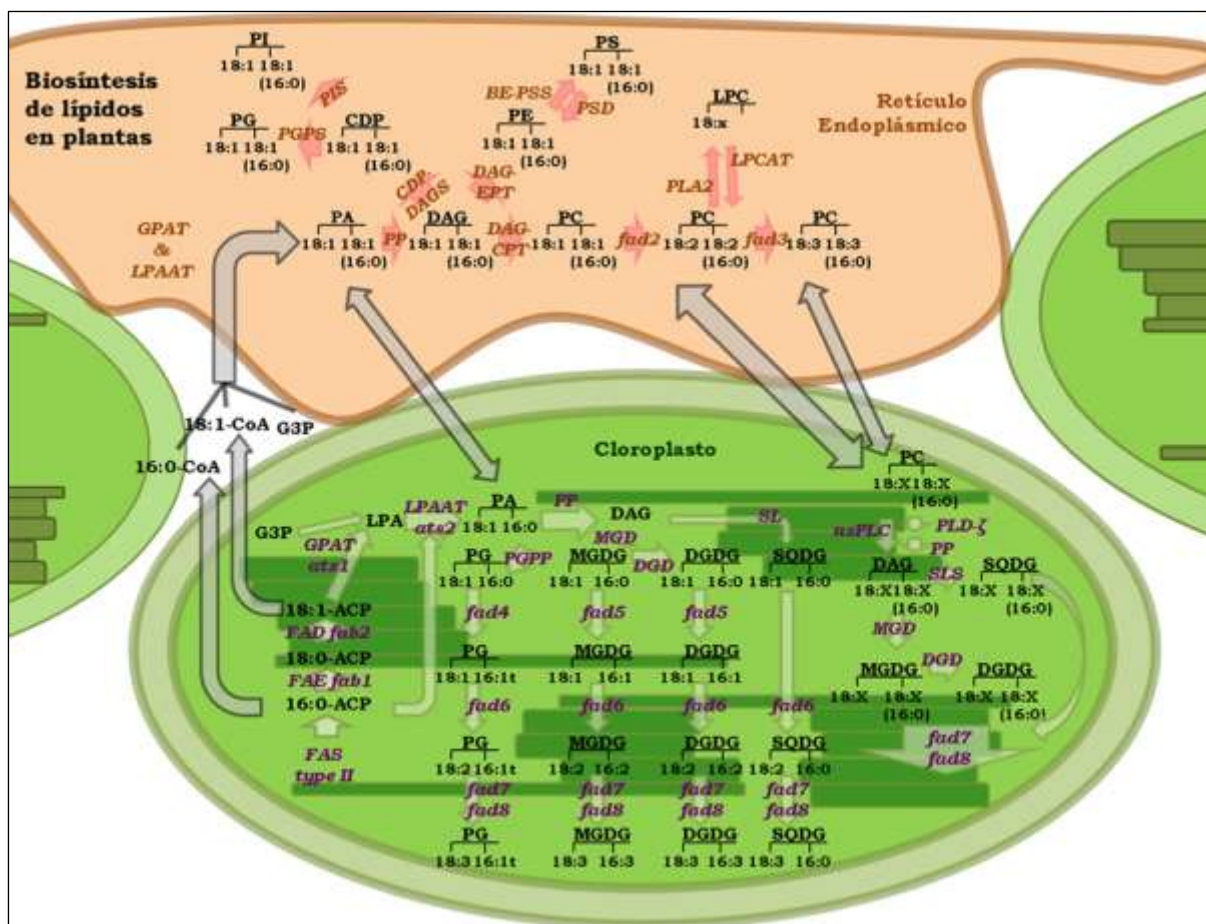


Figura 1.5. Esquema de las dos rutas principales de síntesis de glicerolípidos en plantas.

1.3.1.3. Plantas 16:3 y plantas 18:3

En las plantas denominadas 16:3, tales como *Arabidopsis thaliana* (tale cress), *Lycopersicum esculentum* (tomate), *Spinacia oleracea* (espinaca) o *Solanum tuberosum* (patata) (Mongrand y col., 1998) la síntesis de MGDG, DGDG y SQDG ocurre simultáneamente gracias a las dos rutas (procariota y eucariota) (Browse y col., 1986b). En estas especies existen galactolípidos con 16:3 y 18:3 en el esqueleto de glicerol, aunque la presencia de 16:3 en estos galactolípidos se restringe a la posición sn-2 (Browse y col., 1986b). En *Arabidopsis* la contribución de ambas rutas a la síntesis de galactolípidos es similar (Browse y col., 1986b). Sin embargo, los flujos relativos de lípidos entre rutas varían entre especies, y dependen en cierta

manera del tipo de tejido y el desarrollo de la hoja (Awai y col., 2001). A pesar de que el DGDG se sintetiza a partir del MGDG, en *Arabidopsis* el contenido en ácidos grasos de ambos galactolípidos es diferente. Mientras en el MGDG coexisten las especies 18:3/18:3 y 18:3/16:3 en proporciones similares, en DGDG las especies mayoritarias son 18:3/18:3 y 18:3/16:0 (Siebertz y col., 1980). Esto sugiere que, en *Arabidopsis*, el origen mayoritario del DGDG es eucariótico y el del MGDG es tanto procariótico como eucariótico (Dörmann y Benning, 2002 ; Xu y col., 2005).

Por otro lado, la mayoría de las plantas superiores como *Glycine max* (soja), *Pisum sativum* (guisante) ó *Helianthus annuus* (girasol) son 18:3. En ellas, la síntesis de MGDG, DGDG y SQDG se debe exclusivamente a la ruta eucariota y por lo tanto el 18:3 es el ácido graso mayoritario en esos lípidos (especialmente en posición sn-2). En estas plantas, el único lípido sintetizado por la ruta procariota es PG (Roughan y Slack, 1982).

La presencia de 16:3 en algunos glicerolípidos depende de la especie vegetal. Entre las plantas que sí tienen 16:3, se encuentra una gran variedad de especies cuyos niveles de 16:3 varían desde las que tienen bajos porcentajes como *Cannabis sativa* L. (cáñamo) que tiene un 1 %, a las que tienen porcentajes mayores como *Ranunculus acris* L. (botón de oro) tiene un 17.5 % (Mongrand y col., 1998). Una muestra de la variedad en la composición total de 16:3 en diferentes especies vegetales se muestra en la tabla 1.2.

Especie	% 16:3 total
<i>Ranunculus acris</i> L.	17.5
<i>Brassica oleacea</i> L.	15.9
<i>Ranunculus ficaria</i> L.	13.9
<i>Arabidopsis thaliana</i> L. Heyn	13.8
<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill.	13.8
<i>Spinacia oleacea</i> L.	11.8
<i>Solanum tuberosum</i> L.	11.6
<i>Valeriana officinalis</i> L.	9.7
<i>Rubia tinctorum</i> L.	7.8
<i>Geranium sanguineum</i> L.	7.6
<i>Knautia dipsacifolia</i> (Schrank) Kreuzer	5.4
<i>Sorbus aucuparia</i> L.	3.5
<i>Gladiolus</i> sp.	2.2
<i>Magnolia denudata</i> Desrouss.	1.2
<i>Cannabis sativa</i> L.	1
<i>Linum usitatissimum</i> L.	1
<i>Tamarix gallica</i> L.	0.7
<i>Silene vulgaris</i> (Moench) Garcke	tr.
<i>Cucurbita pepo</i> L.	tr.
<i>Glycine max</i> L. (Merr)	tr.
<i>Vitis vinifera</i> L.	tr.

Tabla 1.2 Contenido en ácido graso 16:3 de algunas plantas. Extraída y adaptada de (Mongrand y col., 1998).

La presencia de 16:3 es común en determinadas familias completas de plantas (Mongrand y col., 1998), siendo más raro encontrar plantas 16:3 y 18:3 dentro de una misma familia. En general, parece que las especies que pertenecen a los grupos taxonómicos más primitivos, son plantas 16:3. Sin embargo entre las plantas 18:3 parece que la pérdida de la ruta procariótica ocurrió de manera independiente y en diferentes etapas de la evolución (Mongrand y col., 1998). Parece que la presión evolutiva no ha sido extremadamente severa con la pérdida de la ruta procariota. La única diferencia entre las plantas 18:3 y las 16:3 parece ser la presencia de la

actividad fosfatidato fosfatasa cloroplástica (Heinz y Roughan, 1983). En el particular caso de *Atriplex lentiformis*, se detecta 16:3 solamente si la planta se crece a temperaturas de 23/18 °C, por debajo de las habituales en su hábitat 40/30°C (Mongrand y col., 1998). Los estudios más recientes en *Arabidopsis* muestran 16:2 y 16:3 en bajas cantidades, en lípidos como PC, PE, PI, PG y SQDG (Burgos y col., 2011), algunos de ellos considerados productos específicos de la ruta eucariota. Esto pone de manifiesto que ambas rutas de síntesis están conectadas de un modo complejo, a pesar del desconocimiento actual de los mecanismos moleculares que permiten la coordinación de la dinámica de las dos rutas, y de las implicaciones biológicas de cada una de ellas.

1.4. DESATURASAS DE ÁCIDOS GRASOS

1.4.1. Características de las desaturasas de ácidos grasos

Las desaturasas son las enzimas que introducen dobles enlaces en la cadena alquílica de los ácidos grasos. La posición de los dobles enlaces insertados por estas enzimas se puede designar mediante el uso de varias nomenclaturas. Así la nomenclatura ω - se refiere a la posición del doble enlace con respecto al grupo metilo ($-\text{CH}_3$) de un extremo del ácido graso (ej. ω -3), mientras que la nomenclatura n- ó Δ - se refiere a la posición desde el grupo carboxilo ($-\text{COOH}$) en el otro extremo (ej. Δ -3 o n-3). Todas las desaturasas de plantas están codificadas por genes nucleares y según su localización utilizan diferentes donadores de electrones, actuando sobre distintos sustratos. En la tabla 1.3 se resumen algunas de las características de las desaturasas de ácidos grasos más comunes de *Arabidopsis*.

Código Atg	Gen	Sustrato	Sustrato (A. graso)	Producto (A. graso)
At2g43710	<i>fab2</i>	Acil-ACP	18:0	18:1
At3g12120	<i>fad2</i>	PL	18:1 Δ^9	18:2 $\Delta^{9,12}$
At2g29980	<i>fad3</i>	PL	18:2 $\Delta^{9,12}$	18:3 $\Delta^{9,12,15}$
At4g27030	<i>fad4</i>	PG	16:0	16:1t
At3g15850	<i>fad5</i>	GL, SL	16:0	16:1c
At4g30950	<i>fad6</i>	GL, SL, PG	16:1 Δ^7 18:1 Δ^9	16:2 $\Delta^{7,10}$ 18:2 $\Delta^{9,12}$
At3g11170	<i>fad7</i>	GL, SL, PG	16:2 $\Delta^{7,10}$ 18:2 $\Delta^{9,12}$	16:3 $\Delta^{7,10,13}$ 18:2 $\Delta^{9,12,15}$
At5g05580	<i>fad8</i>	GL, SL, PG	16:2 $\Delta^{7,10}$ 18:2 $\Delta^{9,12}$	16:3 $\Delta^{7,10,13}$ 18:2 $\Delta^{9,12,15}$

Tabla 1.3 Desaturasas en Arabidopsis, localización, sustratos específicos y reacción que llevan a cabo. Sobre fondo verde se encuentran las localizadas en el cloroplasto y sobre fondo rosa, las del retículo.

Como se observa en la tabla 1.3, en Arabidopsis se han descrito 8 genes que codifican para desaturasas de ácidos grasos (*fab2*, *fad2*, *fad3*, *fad4*, *fad5*, *fad6*, *fad7* y *fad8*). Sin embargo en soja, se han identificado diferentes genes que codifican para cada desaturasa. Así, las desaturasas FAD3 (Bilyeu y col., 2003 ; Anai y col., 2005 ; Torres Franklin y col., 2009), FAD7 (Andreu y col., 2010) y FAD8 (Chi y col., 2011 ; Román y col., 2012) existen como familias de genes en esta especie. De entre las desaturasas más comunes en Arabidopsis, la única desaturasa soluble es FAB2 que actúa sobre sustratos acil-ACP. Las demás desaturasas son de membrana y actúan sobre ácidos grasos esterificados al glicerol (Somerville y col., 2000a). FAB2 se ha localizado en el estroma cloroplástico y se encarga de introducir el primer doble enlace en posición Δ -9 sobre el ácido esteárico (18:0) produciendo ácido oleico (18:1) (Somerville y col., 2000a). Esta enzima se

purificó por primera vez desde semillas de *Carthamus tinctorius* (cártamo) y se observó que su actividad precisaba de la presencia de oxígeno y que formaba un homodímero en vivo (McKeon y Stumpf, 1982). En otro trabajo posterior se observó que la desaturasa poseía 4 átomos de Fe^{3+} por homodímero (2 por monómero) que se reducían a Fe^{2+} al añadir ditionito y retornaban al estado oxidado tras la adición de O_2 y estearoil-CoA (Fox y col., 1993). Se observó que la secuencia de la desaturasa soluble contenía dos motivos de unión a hierro (-D/EX₂H-) (Shanklin y Cahoon, 1998b) y, además, su secuencia completa era muy diferente a las descritas previamente en otros organismos, lo cual sugería que este tipo de enzimas había evolucionado de manera independiente (Shanklin y Somerville, 1991).

Sin embargo, la mayoría de las desaturasas de ácidos grasos son proteínas de membrana, y por lo tanto el estudio de sus características bioquímicas, actividad, localización y purificación es extremadamente dificultoso. Gran parte del conocimiento sobre las desaturasas de membrana proviene del aislamiento de una colección de mutantes de *Arabidopsis* en los años 80 y la identificación de los genes que las codifican en los 90 (Browse y col., 1991 ; Somerville y col., 2000a ; Wallis y Browse, 2002 ; Heilmann y col., 2004a ; Gao y col., 2009). Se ha demostrado la existencia de la actividad desaturasa en diferentes tejidos de distintas especies (Stymne y Appelqvist, 1980 ; Browse y Slack, 1981). Sin embargo, en general, no se ha podido mantener la actividad de estas enzimas en preparaciones solubilizadas con detergente (Ohlrogge y col., 1991). De esto se deduce que el ambiente lipídico de la membrana es crucial para su correcto funcionamiento.

Las desaturasas FAD2 y FAD3 se han localizado en el retículo endoplásmico (Dyer y Mullen, 2001), y generalmente insertan dobles enlaces sobre los ácidos grasos esterificados a PC, aunque no se puede descartar la participación de estas enzimas en la desaturación de ácidos grasos en otras clases de fosfolípidos (Ohlrogge y col., 1991). La ω -6 desaturasa FAD2 (Miquel y Browse, 1992) introduce

un doble enlace en posición ω -6 sobre el ácido oleico (18:1) dando lugar a ácido linoleico (18:2). Y la ω -3 desaturasa FAD3 (Lemieux y col., 1990) lo introduce en posición ω -3 sobre 18:2 produciendo ácido linolénico (18:3). Ambas actúan sobre ácidos grasos esterificados en posición sn-1 ó sn-2 del glicerol y utilizan como donador de electrones el citocromo b_5 , que es a su vez reducido por otra enzima, la citocromo b_5 reductasa (Somerville y col., 2000a). Un trabajo reciente analiza la diferente contribución de los múltiples genes que codifican para citocromos del tipo b_5 de *Arabidopsis thaliana* y *Glycine max* (soja) a la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados, utilizando un mutante de levaduras deficiente en el citocromo b_5 endógeno (Kumar y col., 2012). El trabajo concluye, en términos generales, que no todos los genes que codifican para citocromos en estas plantas son igual de eficientes para llevar a cabo la reacción de desaturación (Kumar y col., 2012).

El resto de desaturasas son FAD4 (Browse y col., 1985 ; Gao y col., 2009), FAD5 (Kunst y col., 1989a ; Heilmann y col., 2004a), FAD6 (Browse y col., 1989), FAD7 (Browse y col., 1986a ; McCourt y col., 1987) y FAD8 (Gibson y col., 1994 ; McConn y col., 1994). De entre ellas FAD4 se ha localizado recientemente en el cloroplasto (Gao y col., 2009). Esta desaturasa actúa sobre 16:0 esterificado en posición sn-2 del PG, produciendo 16:1-trans con el doble enlace en posición Δ -3. Las demás desaturasas de membrana introducen dobles enlaces en configuración cis (Somerville y col., 2000a). El doble enlace con configuración trans no modifica en gran medida la estructura de la molécula de ácido palmítico como sí lo hace el de configuración cis, tal y como se muestra en la figura 1.6.

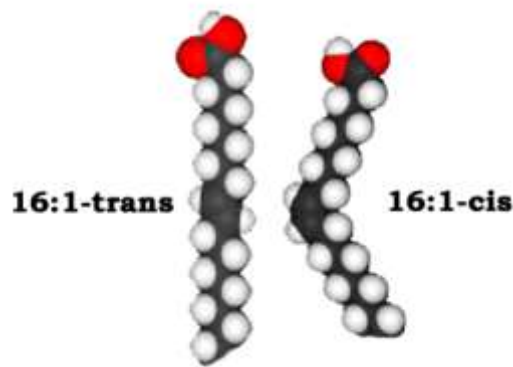


Figura 1.6 Estructura molecular del ácido graso 16:1 dependiendo de la configuración (trans-ó cis-) del doble enlace insertado.

La desaturasa FAD5, es responsable de la síntesis de ácido 16:1-cis con el doble enlace en posición Δ -7, actuando únicamente en posición sn-2 de MGDG y DGDG. Esta desaturasa es capaz de discriminar los ácidos grasos según la longitud de cadena del ácido graso, actuando sólo sobre los de 16 átomos de carbono (Kunst y col., 1989a).

La enzima FAD6 introduce el segundo doble enlace en posición Δ -6 de MGDG, DGDG, PG y SQDG tanto en posición sn-1 como en sn-2, produciendo del mismo modo tanto 16:2 como 18:2 (Somerville y col., 2000a). Un arduo trabajo de aislamiento de membranas de envuelta del cloroplasto, seguido de la solubilización de las proteínas de membrana con Tritón X-100 y una purificación en dos pasos, primero por cromatografía de intercambio iónico con Q-sefarosa y después por cromatografía de afinidad a ferredoxina-sefarosa permitió el aislamiento de la proteína FAD6 de *Spinacia oleacea* (espinaca) (Schmidt y col., 1994). Este trabajo de purificación permitió la secuenciación del extremo N-terminal de la proteína FAD6 de espinaca y esto facilitó el posterior clonaje del cDNA que la codifica (Schmidt y col., 1994).

Las desaturasas FAD7 y FAD8 actúan sobre los ácidos grasos de 16 y 18 átomos de carbono con dos dobles enlaces introduciendo el tercer doble enlace en posición Δ -3 (Somerville y col., 2000a). Estas últimas tampoco tienen selectividad sobre la posición del glicerol a la que van unidos los ácidos grasos. El donador de electrones de las desaturasas plastidiales es la ferredoxina reducida, que recupera su estado reducido bien por la actividad fotosintética durante los periodos de iluminación, o bien por la acción de la ferredoxina-NADP reductasa en periodos de oscuridad (Schmidt y Heinz, 1990b). Tanto FAD5, como FAD6, FAD7 y FAD8 han sido localizadas en el cloroplasto mediante experimentos de proteómica (Ferro y col., 2003 ; Froehlich y col., 2003), sin embargo no existen datos en la literatura basados en técnicas celulares y tampoco sobre su organización en la membrana.

Además de las desaturasas más comunes, se ha descrito la existencia en plantas de otras desaturasas de ácidos grasos, como la Δ -6 estearoil-ACP desaturasa de *Coriandrum sativum* (cilantro) (Cahoon y col., 1992), la Δ -6 palmitoil-ACP desaturasa de *Thunbergia alata* (ojo de poeta) (Cahoon y col., 1994), la Δ -4 palmitoil-ACP desaturasa de la familia *Umbelliferae* (apiáceas) (Cahoon y Ohlrogge, 1994) o la Δ -9 miristoil-ACP desaturasa de *Pelargonium xhortorum* (geranio) (Schultz y col., 1996), aunque estas enzimas son responsables de la síntesis inusual de determinados ácidos grasos monoinsaturados en plantas (Shanklin y Cahoon, 1998b). También se ha descrito la existencia de desaturasas extraplastidiales del tipo ADS (*Arabidopsis* desaturase), como ADS1 y ADS2 (Fukuchi Mizutani y col., 1998). En un trabajo posterior, se mostraba que la secuencia de estas dos enzimas es muy parecida a la de FAD5 (ADS3), y la localización del doble enlace insertado (Δ -7 ó Δ -9) dependía de su localización (plastidial o extraplastidial) (Heilmann y col., 2004a ; Heilmann y col., 2004b). Así, la redirección de *AtFAD5* (Δ -7 desaturasa en el cloroplasto) al citoplasma, provocaba un cambio en su regiospecificidad y la convertía en una Δ -9 desaturasa (Heilmann y col., 2004b). Todo lo contrario ocurría

si las otras dos desaturasas ADS se dirigían al plastidio (Heilmann y col., 2004b). Además de todas las anteriores, otro tipo de desaturasas son las “front-end”, que introducen dobles enlaces entre un doble enlace existente y el extremo carboxilo del ácido graso, y son muy relevantes para los estudios de producción de ácidos grasos beneficiosos para la salud humana en plantas (Sayanova y col., 1997 ; Napier y col., 1999 ; Ruiz Lopez y col., 2012). Una familia más compleja es la de las desaturasas bifuncionales, entre las que se encuentra por ejemplo la desaturasa/conjugasa del árbol *Vernicia fordii* (tung) que transforma $18:1\Delta^{9cis,12cis}$ en $18:3\Delta^{9cis,11trans,13trans}$ ó $18:1\Delta^{9cis}$ en $18:2\Delta^{9cis,12trans}$ (Dyer y col., 2002 ; Shanklin y col., 2009).

1.4.1.1. Secuencias conservadas en las desaturasas

El análisis de las secuencias de aminoácidos de las desaturasas de membrana de plantas reveló que éstas no contenían los motivos de unión a hierro -D/EX₂H- descritos hasta el momento para la desaturasa soluble (Shanklin y Cahoon, 1998b). Sin embargo, por comparación con la secuencia de la Δ^9 -18:0-CoA desaturasa de rata se identificaron diversos residuos de histidinas conservados en posiciones equivalentes (Stukey y col., 1990 ; Shanklin y col., 1994 ; Shanklin y Cahoon, 1998b). La secuencia consenso de estos motivos de histidinas se encuentra en todas las desaturasas de membrana y es la siguiente: -HX₍₃₋₄₎HX₍₇₋₄₁₎HX₍₂₋₃₎HHX₍₆₁₋₁₈₉₎(H/Q)X₍₂₋₃₎HH- (Shanklin y col., 1994 ; Shanklin y Cahoon, 1998b). Los residuos de histidina conservados se reparten en tres cajas (I_a, I_b y II) distribuidas de modo similar a lo largo de la secuencia de las desaturasas de membrana, siendo la secuencia de la caja I_a -HX₍₃₋₄₎H-, la de la caja I_b -HX₍₂₋₃₎HH- y la de la caja II -HX₍₂₋₃₎HH-. En esta última únicamente se sustituye el primer residuo de histidina por uno de glutamina en dos casos, los de las Δ -6 desaturasas de *Anabaena* (Reddy y col., 1993) y *Boragus officinalis* (borraja) (Sayanova y col., 1997). Los ocho residuos de histidina presentes en estos motivos conservados se han descrito esenciales para

la función desaturasa, llegando a esta conclusión mediante la utilización de técnicas de mutagénesis dirigida tanto en la secuencia de la Δ^9 -18:0-CoA desaturasa de rata (Shanklin y col., 1994) como en la Δ^{12} -18:0-CoA desaturasa de *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Avelange-Macherel y col., 1995). Otra prueba adicional a este respecto supuso la ausencia de actividad desaturasa en levaduras, de una forma truncada de la desaturasa *GmFAD3A* carente de una de las cajas de histidinas (Román y col., 2012). Esta forma truncada de mRNA se detectó de forma natural en plantas de soja expuestas al frío (Román y col., 2012). Se ha propuesto que estas cajas de histidina son las responsables de la coordinación de los átomos de hierro que catalizarían la reacción de desaturación también en las desaturasas de membrana, lo cual sería coherente con la pérdida de actividad catalítica tras su sustitución por otros residuos (Somerville y col., 2000a).

Durante esta Tesis Doctoral se realizó un análisis por alineamiento de las secuencias de proteína de las desaturasas de membrana de *Arabidopsis thaliana* y *Glycine max* (soja). Uno de los resultados más relevantes de este estudio fue que los residuos localizados en el interior de las cajas de histidina estaban conservados también entre especies para cada tipo de desaturasa. Las secuencias de las cajas de histidina para cada desaturasa en ambas especies se detallan en la tabla 1.4.

Desaturasas	Cajas de histidinas conservadas		
	I _a	I _b	II
FAD2	HECGH	HRRHH	HVAHH
FAD3	HDCGH	HRTHH	HVIHH
FAD4	HAWAH	HAEHH	
FAD5	HNRLSH	HRYHH	HNNHH
FAD6	HDCAH	HDRHH	HIPHH
FAD7	HDCGH	HRTHH	HVIHH
FAD8	HDCGH	HRTHH	HVIHH

Tabla 1.4 Secuencias de aminoácidos de las cajas de histidina conservadas de las desaturasas de membrana de Arabidopsis y soja.

Como se observa en la tabla 1.4, la única desaturasa de membrana que posee únicamente dos de las tres cajas de histidina conservadas es FAD4. Aunque el mutante de Arabidopsis que evidenció la presencia de esta desaturasa en plantas fue el primer mutante de desaturasas descrito en la literatura (Browse y col., 1985 ; McCourt y col., 1985), la secuencia que codifica para esta desaturasa de Arabidopsis fue hallada recientemente (Gao y col., 2009). El análisis de la secuencia de AtFAD4 reveló que únicamente conservaba dos de las tres cajas de histidina descritas para las desaturasas de membrana, la I_a y la I_b, y que la distribución de ambas a lo largo de la secuencia de la proteína FAD4 era diferente a la habitual (Gao y col., 2009). En el trabajo de Gao y col., (2009) se indica que podría existir otra caja de histidinas adicional, -QGHH-, en la secuencia de AtFAD4 que estaría localizada en una posición anterior a las otras dos, sin embargo se desconoce si ésta es funcional.

Otra de las observaciones realizadas sobre el análisis de las secuencias de las desaturasas de membrana de Arabidopsis (planta 16:3) y soja (planta 18:3) realizado durante esta Tesis Doctoral fue que la caja de histidinas I_a tiene la estructura de -HX₃H- en todas las desaturasas de membrana excepto en las de tipo FAD5, donde la estructura es -HX₄H-. Un alineamiento adicional de las secuencias de desaturasas de ambas especies que producen el mismo tipo de reacción (ω -6 y ω -3), mostró que las cajas de histidina alineadas de este modo también tenían similitudes, esto se muestra en la tabla 1.5.

Desaturasas	Cajas de histidinas conservadas		
	Ia	Ib	II
ω -6 (FAD2, FAD6)	H(E/D)C(G/A)H	H(R/D)RHH	H(V/I)(A/P)HH
ω -3 (FAD3, FAD7, FAD8)	HDCGH	HRTHH	HVIHH

Tabla 1.5 Secuencias de aminoácidos de las cajas de histidina conservadas de las desaturasas de membrana de Arabidopsis y soja. En negro se indican los residuos que son iguales, en azul los que poseen un cambio conservativo y en naranja los diferentes.

Como se observa en la tabla 1.5, las secuencias de aminoácidos de las cajas de histidina conservadas para las ω -3 desaturasas son idénticas, y en el caso de las ω -6 desaturasas, es menos parecida, aunque algunos de los cambios observados son conservativos. En el alineamiento de las secuencias completas también se observaba una mayor homología entre las secuencias de las ω -3 desaturasas que entre las de las ω -6. En el caso de las cajas de histidina de las ω -6 desaturasas de Arabidopsis y soja se observó que la caja I_a de las ω -6 desaturasas tipo FAD2 tiene la secuencia -HX₃HH- y la de las de tipo FAD6 tiene la secuencia -HX₃H-. En la figura 1.7 se muestra un alineamiento de las secuencias de proteína de las ω -3 desaturasas de Arabidopsis y soja.

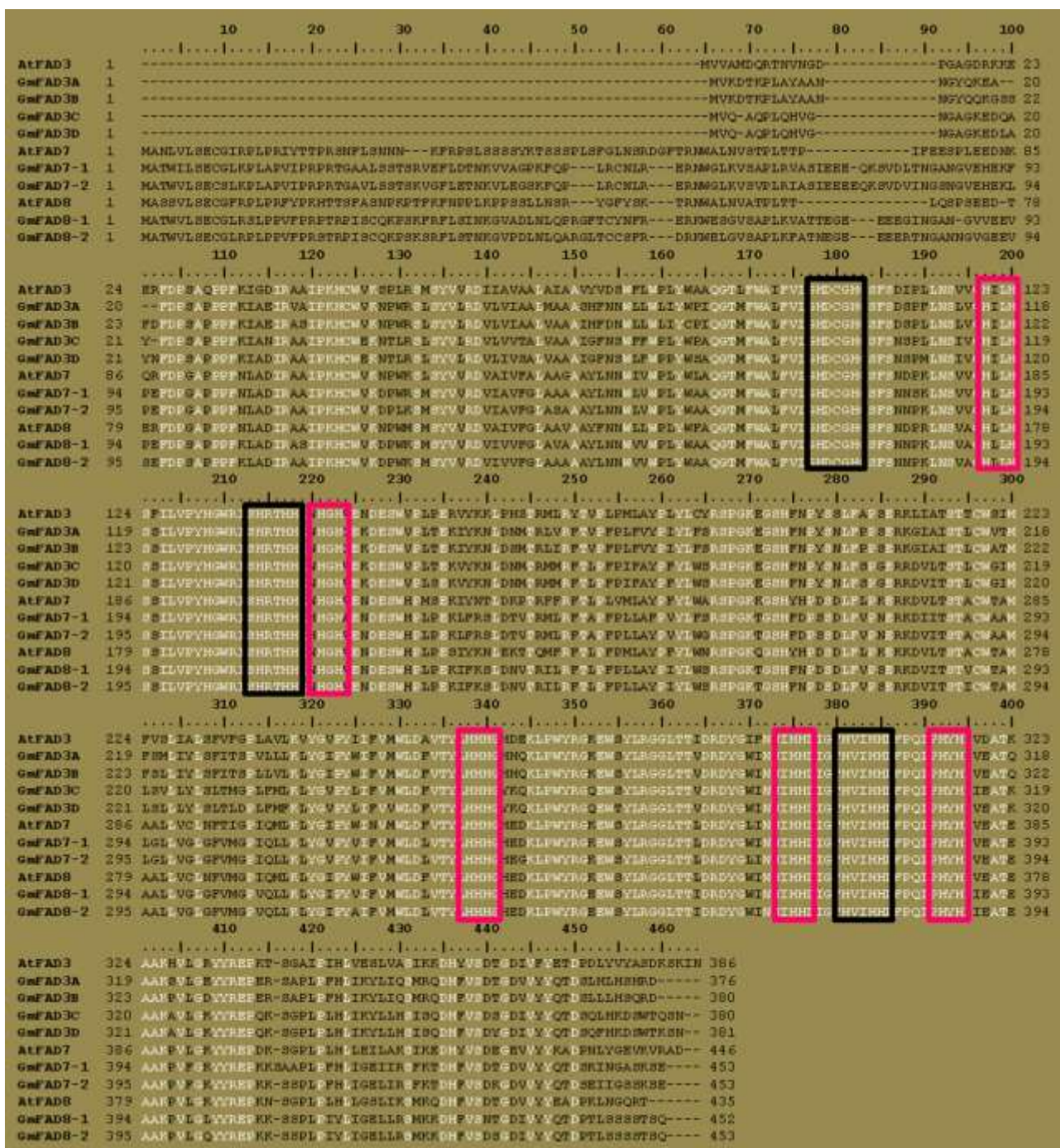


Figura 1.7 Alineamiento de las secuencias de las ω -3 desaturasas de *Arabidopsis* y Soja.

Recuadradas en negro estan las cajas de histidina descritas para todas las enzimas desaturasas y en rosa las conservadas de modo adicional.

El alineamiento de las secuencias de las ω -3 desaturasas de *Arabidopsis* y soja mostró que, además de las cajas de histidina descritas hasta el momento (enmarcadas en negro en la figura 1.7), existían otras cajas de histidina adicionales conservadas a lo largo de la secuencia (enmarcadas en rosa en la figura 1.7), el posible sentido biológico de la presencia de estas histidinas adicionales en la secuencia de las ω -3 desaturasas requeriría la realización de experimentos de mutagénesis dirigida.

El análisis de las secuencias completas de las desaturasas del retículo permitió encontrar el motivo de retención en el retículo endoplásmico localizado en el extremo C-terminal de las proteínas tipo FAD2 en ambas especies (el motivo -YXXL/Y- rico en aminoácidos aromáticos) (McCartney y col., 2004). Por otro lado, las secuencias de proteína de FAD3 en *Glycine max* (soja) no contenían los dos residuos de lisina situados a -3 y -5 del extremo C-terminal que se han descrito necesarios para la retención de este tipo de proteínas en el retículo endoplásmico (McCartney y col., 2004). Sin embargo, en el trabajo de McCartney y col., (2004) se utilizan muchas más secuencias de desaturasas tipo FAD2 que del tipo FAD3 para llegar a las secuencias consenso en cada caso, y además, la secuencia consenso de las desaturasas tipo FAD2 es contrastada con otras proteínas que realizan actividades enzimáticas muy diversas que también conservan ese motivo. La menor cantidad de secuencias utilizadas para llegar a la secuencia consenso de retención en el retículo endoplásmico para las desaturasas tipo FAD3 (McCartney y col., 2004), puede ser la explicación de que esta secuencia consenso no se encuentre en las FAD3 de *Glycine max* (soja).

1.4.1.2. Estructura y topología transmembrana

La única desaturasa de plantas que ha sido cristalizada es la Δ -9 estearoil ACP desaturasa soluble (FAB2) de *Ricinus communis*, que inserta un doble enlace en la

posición Δ -9 del 18:0-ACP para formar ácido oleico (18:1). Su estructura se muestra en la figura 1.8.

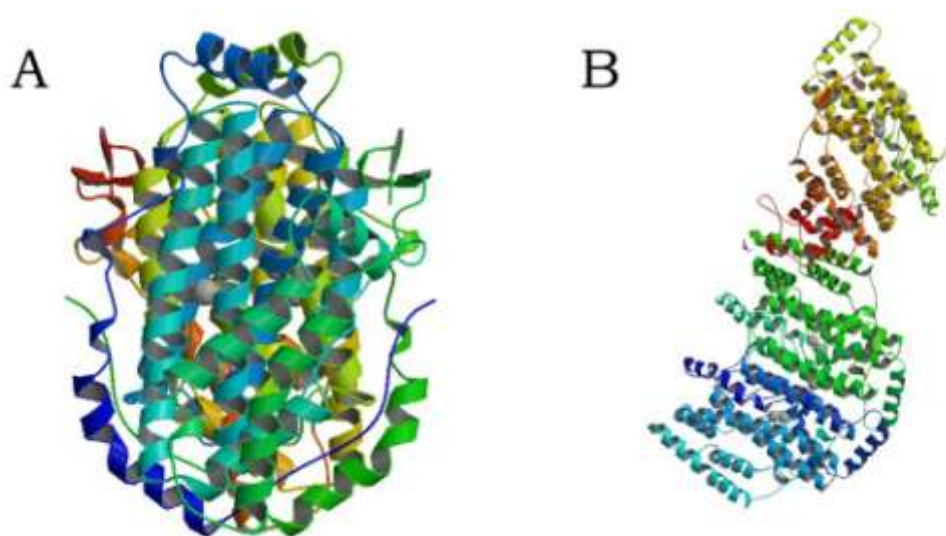


Figura 1.8 (A) Estructura del homodímero de la Δ -9 estearoil ACP desaturasa de *Ricinus communis* (1AFR) (Lindqvist y col., 1996). (B) Estructura del homodímero de la Δ -9 estearoil ACP desaturasa de *Ricinus communis* unido a la proteína transportadora de acilos (ACP) (2XZO) (Guy y col., 2011). Extraídas del Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

Como se observa en la figura 1.8, la estructura de la Δ -9 estearoil ACP desaturasa soluble de *Ricinus communis* es un homodímero en el que cada uno de los monómeros consta de 11 α -hélices, 9 de las cuales forman un fardo de hélices α antiparalelas (Lindqvist y col., 1996). En el interior de cada fardo de hélices α se localizan los dos átomos de hierro (de color gris en la figura) que están coordinados por varios residuos localizados en cuatro hélices α del fardo (Lindqvist y col., 1996). En la desaturasa soluble de *Ricinus communis* (y de modo similar en otras desaturasas solubles de otros organismos), uno de los átomos de hierro está coordinado por un residuo de glutámico (Glu¹⁰⁵) de manera bidentada y por un residuo de histidina (His¹⁴⁶) mediante interacción simple, y el otro está coordinado

por otro residuo de glutámico (Glu¹⁹⁶) y por otro de histidina (His²³²) a través del mismo tipo de interacciones (Lindqvist y col., 1996 ; Shanklin y col., 2009). Además, ambos átomos de hierro están estabilizados a su vez por dos residuos adicionales de glutámico (Glu¹⁴³ y Glu²²⁹) (Lindqvist y col., 1996 ; Shanklin y col., 2009).

En las desaturasas solubles, la presencia de un centro dihierro es un hecho que corresponde a evidencias experimentales, sin embargo, en el caso de las desaturasas de membrana la presencia de un centro activo de características similares, es hasta la fecha hipotética, y corresponde a la asunción de que los 8 residuos de histidina conservados en 3 motivos a lo largo de la estructura podrían estar uniendo un centro activo formado también por átomos de hierro (Shanklin y col., 2009). Sin embargo, sí se han encontrado evidencias experimentales de la presencia de un centro dihierro en la proteína alcano- ω -hidroxilasa de *Pseudomonas oleovorans*, que es una proteína de membrana similar a las desaturasas y que también requiere hierro y oxígeno para su actividad (Shanklin y col., 1997). Los estudios de mutagénesis dirigida de los 8 residuos de histidina en la alcano- ω -hidroxilasa (conservados del mismo modo que en las desaturasas de membrana) demostraron que también son esenciales para su actividad (Shanklin y Whittle, 2003). Así pues, por homología con la alcano- ω -hidroxilasa, se supone que las cajas de histidina de las desaturasas de membrana son relevantes para la coordinación del centro activo y su correcta funcionalidad.

A pesar de que en la estructura cristalina de la Δ -9 estearoil ACP desaturasa soluble la disposición del centro activo así como de los residuos que lo coordinan está localizada en un bolsillo interior que forman las 9 hélices α antiparalelas que forman el fardo (Cahoon y col., 1997), la topología propuesta para las desaturasas de membrana en plantas hasta el momento sitúa las cajas de histidina y el centro

activo de éstas enzimas fuera de la membrana (Shanklin y col., 1994 ; Dyer y Mullen, 2001 ; Dyer y col., 2002 ; Tang y col., 2005). El modelo propuesto para las desaturasas de membrana de plantas está claramente inspirado en el propuesto en 1990 para la desaturasa OLE1 de levaduras (Stukey y col., 1990). Además el descubrimiento de un tipo especial de desaturasas “front-end” que tienen fusionado en su secuencia (principalmente en el extremo C-terminal) un motivo de secuencia similar al citocromo b5 en levaduras (Mitchell y Martin, 1995) como en plantas (Sperling y col., 1995) y que son funcionales *per se* aportaba más evidencias para esta hipótesis. En este tipo de desaturasas, la localización de las cajas de histidina coincidía al mismo lado de la membrana que el citocromo b5, lo cual llevó a la hipótesis de que la desaturación se producía fuera de la membrana (Shanklin y Cahoon, 1998b).

En la figura 1.9 se muestran dos ejemplos de la topología transmembrana propuesta para las desaturasas de membrana de plantas.

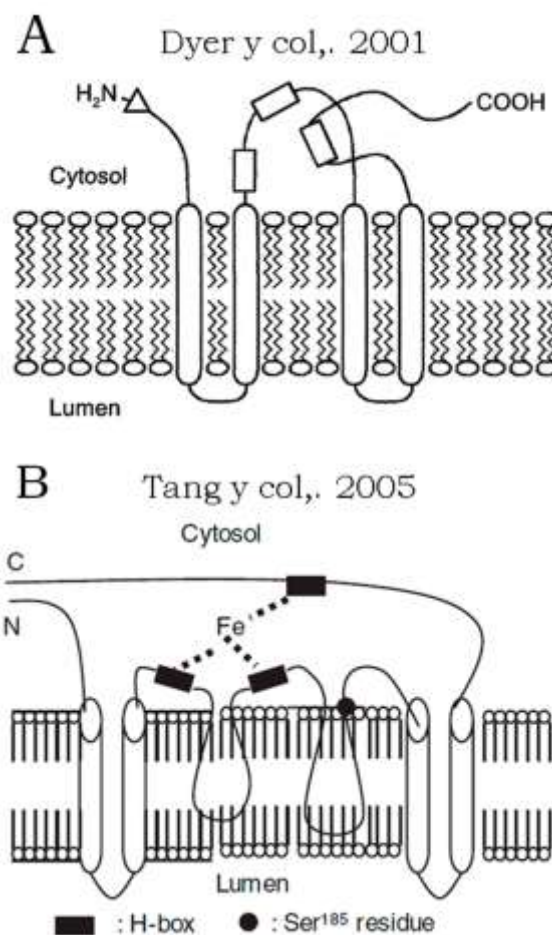


Figura 1.9 Topología transmembrana propuesta para las enzimas desaturasas de plantas.

Extraídas y adaptadas de (Dyer y Mullen, 2001) y (Tang y col., 2005).

La topología observada en estos modelos se debe a la localización de las tres cajas de histidina conservadas, hacia el mismo lado de la membrana, sin embargo un análisis de las secuencias de las diferentes desaturasas de ácidos grasos de membrana en *Arabidopsis* y soja realizado durante esta Tesis Doctoral, utilizando programas de predicción de topología transmembrana, mostró que las cajas de histidina no se localizaban al mismo lado de la membrana en la amplia mayoría de los casos. Estos datos se ilustran en la figura 1.10.

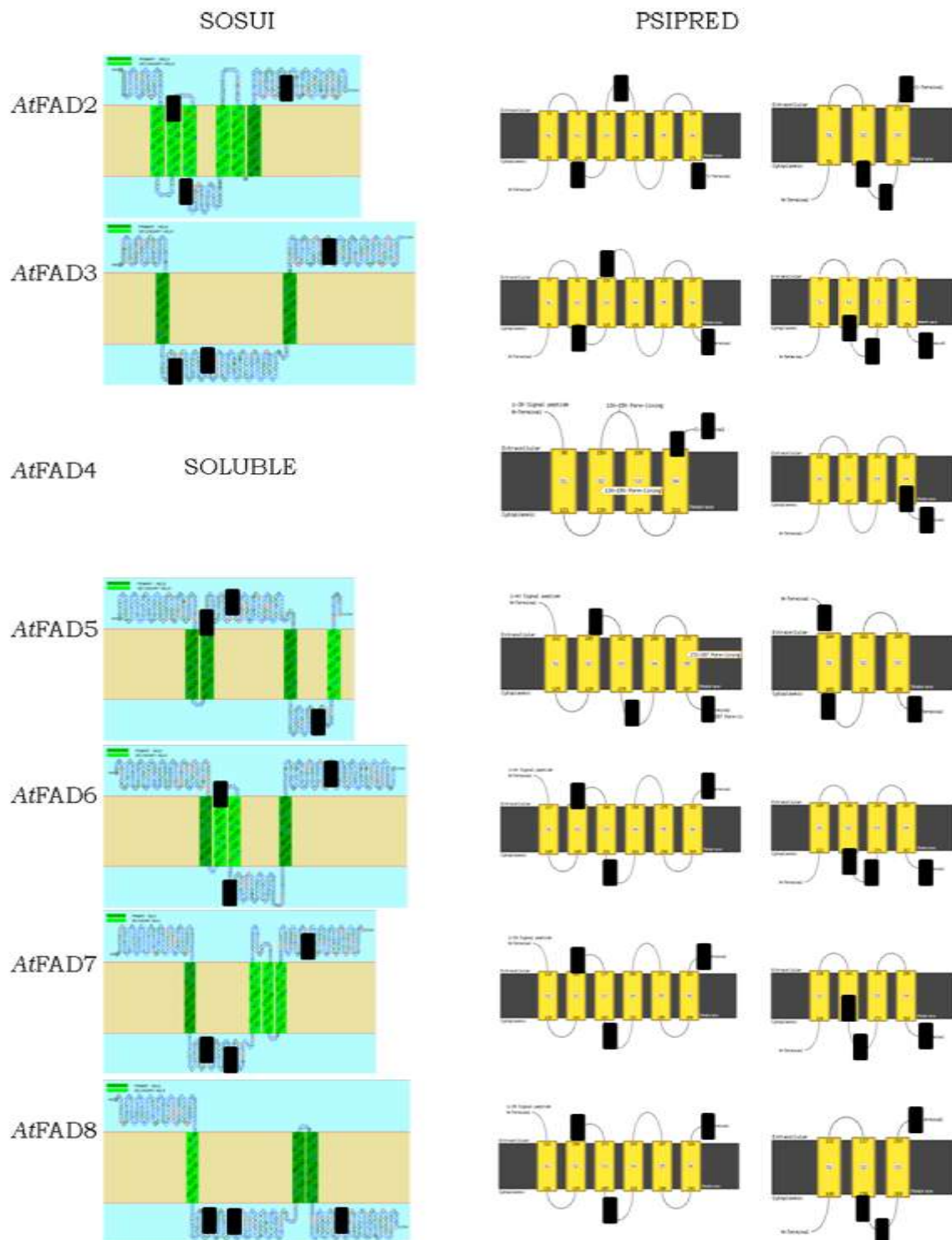


Figura 1.10 Topología transmembrana de las desaturasas de membrana de Arabidopsis obtenidas con dos programas diferentes, SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>) y PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). El programa PSIPRED predice dos topologías diferentes para cada proteína mediante el uso de dos programas de predicción de manera

simultánea. Las cajas negras indican la ubicación aproximada de las tres cajas de histidina conservadas en todas las enzimas desaturasas.

Como se observa en la figura 1.10, la topología transmembrana es diferente para cada desaturasa de membrana. La utilización durante éste análisis de dos programas de predicción diferentes (SOSUI <http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/> y PSIPRED <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) que ofrecen en total 3 predicciones posibles para cada una de las desaturasas permite decir que quizá, las 3 cajas de histidina conservadas en todas las desaturasas no estén localizadas en el mismo lado de la membrana. Al ser las desaturasas proteínas de membrana (proteínas hidrofóbicas) que utilizan glicerolípidos (moléculas hidrofóbicas que forman parte de las bicapas lipídicas) como sustrato, no es extraño pensar que la reacción de desaturación se pudiera producir en el interior de la membrana. Si esta hipótesis fuera cierta, la localización en una hipotética configuración tridimensional de las cajas de histidina (aunque situadas en los segmentos solubles de la proteína) y del centro activo, podría ser intramembranal donde las hélices transmembrana podrían estar formando una cavidad que permitiría desarrollar la actividad desaturasa en el interior de la membrana. Esta hipótesis *a priori*, dificultaría la interacción del donador de electrones (citocromo b_5 ó ferredoxina) con la desaturasa para el traspaso de electrones, pero este mecanismo es desconocido incluso para el caso de la Δ -9 estearoil ACP desaturasa cristalizada hasta el momento (Shanklin y Cahoon, 1998b). Lo cierto es que los estudios sobre la topología transmembrana de las desaturasas son escasos y no existe ningún modelo sobre la topología 3D de las desaturasas de membrana. Además de que existe un gran desconocimiento sobre cómo ocurre la interacción entre las desaturasas de ácidos grasos y sus donadores de electrones, o incluso la interacción con otras proteínas. Todas estas lagunas dejan un amplio margen para la elaboración de hipótesis. La ausencia de

información de este tipo se debe a la dificultad de trabajo con proteínas de membrana como las desaturasas, debido a su alto grado de hidrofobicidad, propiedad que dificulta también su purificación y caracterización bioquímica mediante la utilización de técnicas tradicionales (Somerville y col., 2000a).

1.4.2. La reacción de desaturación

En una reacción de desaturación intervienen además del ácido graso y la desaturasa, una molécula de oxígeno y un donador de electrones. En la figura 1.11 se muestra un esquema de los pasos de esta reacción.

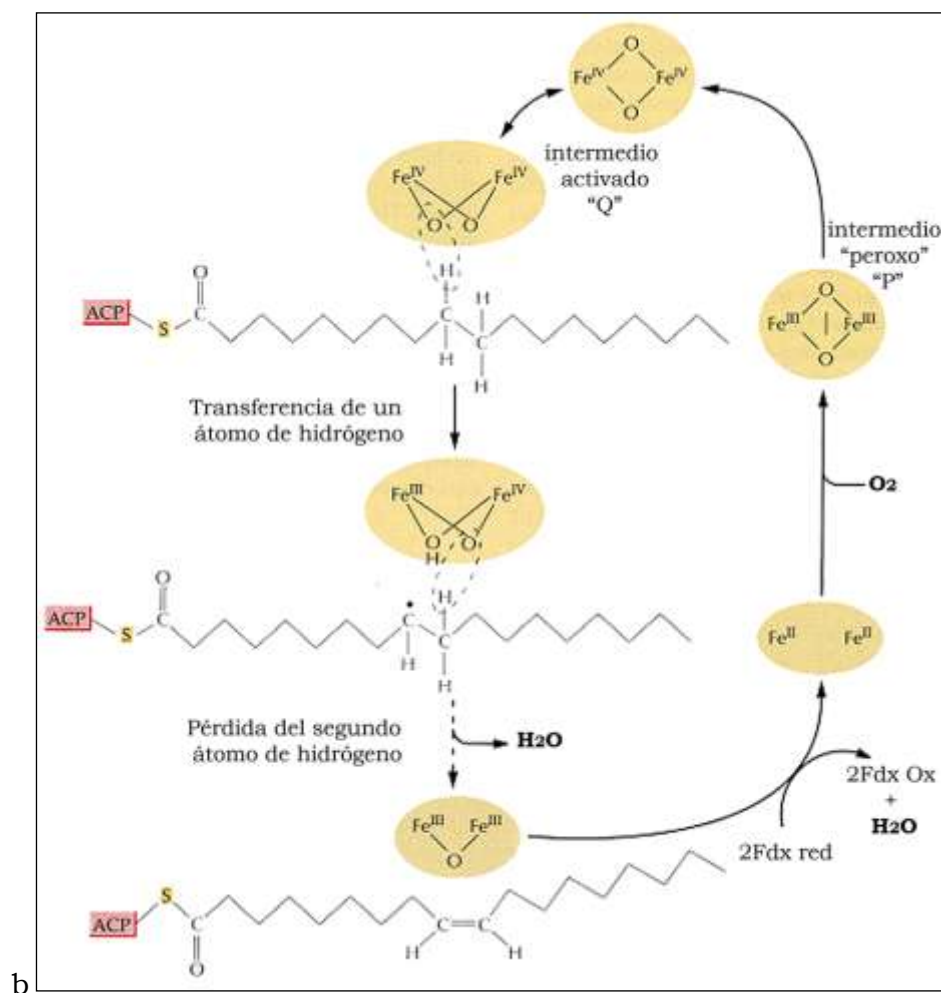


Figura 1.11 Esquema de los pasos llevados a cabo en la reacción de desaturación de los ácidos grasos en plantas. Extraída y adaptada de (Somerville y col., 2000a).

El mecanismo propuesto para la desaturación de ácidos grasos se muestra en la figura 1.7. En el estado basal, el centro dihierro de la enzima se encuentra en su forma oxidada, $\text{Fe}^{\text{III}}\text{-O-Fe}^{\text{III}}$ (en la parte de debajo de la figura). La transferencia electrónica desde el donador de electrones correspondiente al centro dihierro resulta en la formación de un estado reducido, $\text{Fe}^{\text{II}}\text{-Fe}^{\text{II}}$. Para las desaturasas plastidiales el donador de electrones propuesto es la ferredoxina (Schmidt y Heinz, 1990b), y para las desaturasas reticulares el citocromo b_5 (Miquel y Browse, 1998). Tras la formación del estado reducido del centro dihierro, el oxígeno molecular se une al centro activo de la enzima generando un intermedio peroxo 2Fe-2O ("P"). La ruptura del enlace entre átomos de oxígeno da lugar a una forma activada del centro dihierro ("Q") que actúa como compuesto oxidante capaz de atraer de manera sucesiva dos átomos de hidrógeno de dos grupos metileno del ácido graso consecutivos. La transferencia del primer átomo de hidrógeno da lugar a un intermedio radical alquilo. La pérdida del segundo átomo de hidrógeno origina una especie transitoria que contiene dos electrones desapareados y que podría recombinarse de forma espontánea para formar un doble enlace. Esta reacción concluye con la pérdida de una molécula de agua y la regeneración de la forma oxidada del sitio activo de la enzima (Shanklin y Cahoon, 1998a ; Somerville y col., 2000b). La recuperación del estado reducido de la ferredoxina podría ocurrir bien por la actividad fotosintética habitual en periodos de luz, o bien por la acción de la Ferredoxina-NADP reductasa y el NADPH en periodos de oscuridad (Schmidt y Heinz, 1990b). Hasta la fecha se desconoce tanto el sitio de unión de la desaturasa con la ferredoxina como el camino que recorren los electrones desde ésta hasta el centro dihierro (Sperling y col., 2003).

1.4.3. Regulación de la actividad desaturasa

Existen numerosos factores que participan de la regulación global de las desaturasas, como son la temperatura, el desarrollo de la planta, la herida o las hormonas vegetales. La regulación por herida y por hormonas vegetales (a través de interacciones tanto sinérgicas como antagónicas) parecen ser dependientes del estadio del desarrollo vegetal (Nishiuchi y Iba, 1998 ; Matsuda y col., 2001). A continuación se detallan los aspectos más importantes de la regulación de las desaturasas de plantas por temperatura y desarrollo.

1.4.3.1. Temperatura

La temperatura es uno de los factores más relevantes que influye en el crecimiento y desarrollo vegetal, pues es un factor de variación estacional que se modifica además, a lo largo de las 24 horas que conforman un día, en función de la meteorología local (Ruelland y Zachowski, 2010). La capacidad de una especie vegetal para tolerar los cambios de temperatura así como las temperaturas extremas limita su distribución geográfica. Los cambios de temperatura ejercen en las células vegetales numerosos cambios a nivel fisiológico. Así, el frío produce la reducción de la actividad enzimática, al aumento en la rigidez de las membranas, la desestabilización de los complejos proteicos, la estabilización de la estructura secundaria del mRNA, la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) o la disfunción de la fotosíntesis (Ruelland y Zachowski, 2010). De un modo más extremo, la congelación puede llevar a la muerte celular (Ruelland y col., 2009). Por otra parte, el calor produce el desplegamiento de las proteínas, afecta a la fluidez de las membranas y al metabolismo, e induce el reordenamiento del citoesqueleto (Ruelland y Zachowski, 2010). Aunque los cambios de temperatura también son necesarios para el correcto desarrollo de algunas funciones en plantas, como la vernalización necesaria para la floración o la germinación (Ruelland y Zachowski,

2010). En relación con los lípidos de membrana, la fluidez de las membranas y la temperatura son parámetros estrechamente relacionados. Las membranas o bicapas lipídicas son mosaicos de lípidos y proteínas en continuo movimiento (Ruelland y Zachowski, 2010). Los lípidos pueden moverse intercambiando su posición entre monocapas de una bicapa (flip-flop), difundir a lo largo de una monocapa o rotar en torno a su propio eje, y todos estos movimientos están termodinámicamente controlados por la temperatura ambiental (Ruelland y Zachowski, 2010). El descenso de las temperaturas provoca la ralentización de estos movimientos dando lugar a la rigidez de las membranas, y el aumento de las temperaturas provoca la aceleración de estos movimientos aportando mayor fluidez a las membranas (Ruelland y Zachowski, 2010). La fluidez de las membranas depende de la composición lipídica, el contenido en proteínas y el contenido en esteroides (Vaultier y col., 2006). En cuanto a la composición lipídica de las membranas vegetales tanto el contenido parcial de cada lípido, como la insaturación de los ácidos grasos esterificados a los glicerolípidos provocan variaciones en la fluidez de la membrana (Iba, 2002). Las bicapas generadas de modo artificial sufren un cambio de fase de líquido-cristalino a una fase más sólida denominada gel cuando desciende la temperatura (Iba, 2002). Este cambio de fase ocurre a una temperatura característica para cada tipo de membrana que depende de su composición. En varios trabajos se comprobó que la presencia de 16:0 y 16:1-trans en PG (ó PG saturado), era alta en especies vegetales sensibles al frío y bajas en especies tolerantes (Murata y col., 1982 ; Murata, 1983). Un trabajo posterior aportaba la observación de que el PG de las especies sensibles al frío cambiaba de fase a la temperatura de 30°C, y el PG de las especies tolerantes lo hacía a 15°C (Murata y Yamaya, 1984) . Todo esto sugiere que el cambio de fase en las membranas vegetales y la proporción en PG saturado, tienen relación con la adaptabilidad de las especies vegetales al frío (Douce, 1974 ; Murata y Yamaya,

1984 ; Iba, 2002). Otra característica de las especies sensibles al frío es que en la posición sn-1 de PG es más abundante el ácido palmítico (16:0) de modo diferente a las especies tolerantes, que poseen principalmente 18:1 esterificado en esta posición (Iba, 2002). Estas diferencias resultan de la actividad glicerol-3-fosfato aciltransferasa cloroplástica (GPAT1 ó ATS1 en Arabidopsis) y esto llevó al planteamiento de que la tolerancia o sensibilidad al frío dependía de las características de genes concretos (Murata y col., 1992). Los experimentos llevados a cabo en este aspecto apuntaban que el nivel de saturación de PG plastidial es uno de los factores determinantes, aunque no el único, que influye en la sensibilidad de las plantas al frío (Iba, 2002). También parece que los brasinosteroides también juegan un papel importante en la fluidez de las membranas, en modo análogo a lo que sucede en mamíferos (Dhaubhadel y col., 1999 ; Dhaubhadel y col., 2002 ; Kagale y col., 2006 ; Divi y col., 2010). Los brasinosteroides participan, entre otros tipos de estrés, en la tolerancia al frío, al calor, a la sequía y a la salinidad (Krishna, 2003), y su acción parece estar coordinada con la respuesta de otras fitohormonas como el ácido abscísico, el salicílico y el etileno (Divi y col., 2010).

En cuanto al nivel de insaturación de los ácidos grasos, la secuencia de reacciones de desaturación que ocurren sobre éstos provoca cambios en la topología de los mismos que inducirían un mayor desorden en la membrana aumentando de éste modo la fluidez de la misma. La figura 1.12 resume los cambios producidos durante esta secuencia de reacciones.

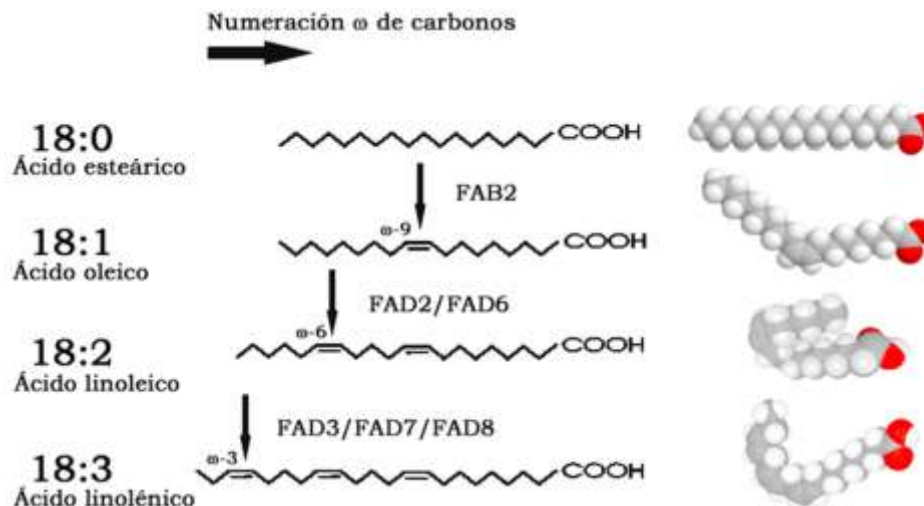


Figura 1.12 Esquema de las reacciones de desaturación sobre los ácidos grasos de 18 átomos de carbono en plantas.

Como se observa en la figura 1.12, las sucesivas reacciones de desaturación sobre los ácidos grasos de 18 átomos de carbono (y de modo similar sobre los de 16C) que dan lugar a la síntesis de ácido linolénico (18:3) producen modificaciones en la topología de estos ácidos grasos. De modo general, las membranas con mayor índice de ácidos grasos poliinsaturados poseen una mayor fluidez (Iba, 2002). El análisis de los mutantes de *Arabidopsis fad5* y *fad6* (deficientes en la actividad de las Δ -9 y ω -6 desaturasas plastidiales, respectivamente) reveló que no mostraban diferencias fenotípicas cuando crecían a 22 °C, pero sí cuando lo hacían a 5 °C (Hugly y Somerville, 1992). Las hojas nuevas de estos mutantes desarrolladas durante la exposición al frío mostraban clorosis, mientras que las de la línea silvestre no lo hacían. En estas condiciones, los cloroplastos de las líneas mutantes eran más pequeños y la cantidad de membranas tilacoidales se reducía hasta en un 70 % (Hugly y Somerville, 1992). Por otro lado, el análisis del mutante *fad2* de *Arabidopsis* (deficiente en la actividad de la ω -6 desaturasa reticular) reveló que la exposición continuada de este mutante al frío inhibía el crecimiento, llegando

incluso a marchitarse y morir (Miquel y col., 1993). En general, los ácidos grasos trienoicos son los más abundantes en los lípidos de membrana. Estos son ácidos grasos con tres enlaces de configuración *cis* que se forman desde los ácidos grasos dienoicos a través de la actividad de las ω -3 desaturasas (Iba, 2002). La sobreexpresión de *AtFAD7* (ω -3 desaturasa plastidial) en plantas de tabaco produjo un aumento en el nivel total de ácidos grasos trienoicos y una mayor resistencia al frío de las hojas más jóvenes (Kodama y col., 1994 ; Kodama y col., 1995). Sin embargo, la sobreexpresión de *NtFAD3* (ω -3 desaturasa reticular) en plantas de tabaco no provocaba este efecto (Hamada y col., 1998), aunque parece que sí producía tolerancia al frío durante la germinación y el desarrollo de la plántula en el caso de arroz (Iba, 2002).

En cuanto a las ω -3 desaturasas responsables de la producción de ácidos grasos trienoicos en condiciones de frío, se ha asumido que el papel principal recae sobre *FAD8*, ya que los mutantes *fad7-1* y *fad7-2* expuestos a las bajas temperaturas tenían un patrón de acumulación de ácidos grasos trienoicos dependiente de la temperatura (Gibson y col., 1994 ; McConn y col., 1994). Sin embargo, existen numerosos indicios que indican que todas las ω -3 desaturasas de *Arabidopsis* son más activas a temperaturas más bajas, siendo esto bastante lógico, ya que su actividad es necesaria para aumentar la fluidez de la membrana, lo cual no es necesario a temperaturas más elevadas. Por ejemplo, en el trabajo de McConn y col., (1994) se observa que el doble mutante *fad7-1/fad8* también produce mayor nivel de ácidos grasos insaturados a menor temperatura, lo cual estaría indicando que *AtFAD3* (la única ω -3 desaturasa funcional en este mutante) es también más eficiente a temperaturas más bajas. Un trabajo reciente de nuestro grupo evidenció que la actividad de las ω -3 desaturasas reticulares de soja (*GmFAD3A* y *GmFAD3B*) es mayor a menor temperatura (Román y col., 2012), lo cual sería coherente con los resultados obtenidos con el doble mutante *fad7-1/fad8* en *Arabidopsis* (McConn y

col., 1994). En el trabajo de nuestro grupo, tras la exposición al frío de plantas de soja, se observó un aumento en los mRNAs de *GmFAD3A* y *GmFAD7-2*, que sin embargo, no se traducían en un gran aumento de los niveles de 18:3 (en torno al 5 %), que son ya de por sí muy elevados en este tejido (Román y col., 2012). Adicionalmente, el mayor aumento en ácidos grasos trienoicos se ha observado en raíces de trigo tras la exposición a 10 °C (Horiguchi y col., 2000), la raíz es un tejido no fotosintético donde se ha descrito que la principal actividad ω -3 desaturasa es la de FAD3 (Lemieux y col., 1990) ya que la ruta eucariota es la predominante en este tejido (Xu y col., 2005). De modo adicional, en el trabajo de McConn y col., (1994) la composición de ácidos grasos de los mutantes *fad7* y *fad8* a 12 °C y 28 °C muestra que, a 12 °C, el mutante *fad8* produce más ácidos grasos trienoicos que el mutante *fad7* (McConn y col., 1994), lo cual indicaría que la eficiencia de la actividad desaturasa *AtFAD7* en frío es mayor que la de *AtFAD8*. Estos datos serían coherentes con los aportados por trabajos anteriores, donde la sobreexpresión de *AtFAD7* producía una mayor tolerancia al frío en plantas de tabaco (Kodama y col., 1994 ; Kodama y col., 1995).

Un trabajo posterior identificó que la abundancia de la proteína *AtFAD8* es mayor a temperaturas normales de crecimiento de *Arabidopsis* (22°C) que a temperaturas más altas (27°C) y que la secuencia C-terminal de la proteína *AtFAD8* es la responsable de su estabilidad en frío, o mejor dicho, de su desaparición en calor, lo cual significa que su regulación por temperatura en *Arabidopsis* es a nivel post-transcripcional (Matsuda y col., 2005). Estos datos serían coherentes con los presentados por McConn y col., (1994) donde, a la temperatura de 28 °C, el mutante *fad7* de *Arabidopsis* tiene niveles mucho menores de ácidos grasos trienoicos que el mutante *fad8* (*FAD8* sería menos funcional que *FAD7* a 28 °C) pero no implican que esta desaturasa tenga un patrón exclusivo de expresión y función en frío. A este respecto, se han publicado varios trabajos en otras especies

que apuntan hacia la misma conclusión. Por ejemplo en soja se observa que el mRNA de *GmFAD8-1* y *GmFAD8-2* está presente a temperaturas normales de crecimiento (Andreu y col., 2010 ; Román y col., 2012), y durante esta Tesis Doctoral se ha podido comprobar que también ocurre lo mismo en *Arabidopsis*. Aunque en otras especies como maíz, se ha descrito un aumento del mRNA *ZmFAD8* en frío acompañado de un descenso del mRNA *ZmFAD7* (Berberich y col., 1998), sin embargo los datos de la expresión diferencial de estos dos genes presentados en este trabajo con maíz son poco claros a este respecto. Todos estos resultados presentan evidencias de que el aumento en ácidos grasos trienoicos produce una mayor tolerancia al frío, sin embargo este aumento es menor del esperado y podría limitarse a determinados tejidos de determinadas especies vegetales (Iba, 2002). Sin embargo, el concepto contrario, la disminución de la insaturación de los ácidos grasos y la tolerancia a las altas temperaturas sí parecen estar íntimamente relacionadas (Iba, 2002). Por ejemplo el trabajo de (Matsuda y col., 2005), sobre la pérdida de estabilidad de la proteína *AtFAD8* en calor, o la disminución de la producción de ácidos grasos trienoicos en el mutante *fad7* a elevadas temperaturas (McConn y col., 1994) serían ejemplos claros sobre la relación de las altas temperaturas y la disminución de la actividad ω -3 desaturasa. En otros trabajos se obtuvieron similares resultados, por ejemplo el silenciamiento de la ω -3 desaturasa plastidial de tabaco producía plantas más tolerantes a las altas temperaturas (Murakami y col., 2000). Adicionalmente, la tolerancia a la temperatura de diversos mutantes descritos en la literatura, se debe a la disminución en la insaturación de los ácidos grasos, como en el caso del mutante *str7* de soja (Alfonso y col., 2001) o los mutantes *fad5* y *fad6* de *Arabidopsis* (Hugly y col., 1989 ; Kunst y col., 1989a).

1.4.3.2. *Desarrollo de la planta*

El desarrollo de una planta es un proceso extremadamente complejo durante el cual, a partir de la semilla y utilizando diversos programas específicos de desarrollo se genera una amplia diversidad de tejidos que maduran con el tiempo. Cada tejido posee unos requerimientos nutricionales y una composición metabólica diferente. En cuanto a la composición de ácidos grasos en tejidos, en las semillas el ácido graso mayoritario es el linoleico (18:2) (Heppard y col., 1996 ; Andreu y col., 2010) y sin embargo, en las hojas es el linolénico (18:3) (Horiguchi y col., 1996a ; Horiguchi y col., 1996b ; Horiguchi y col., 1998 ; Andreu y col., 2010). Dada la diferente composición de ácidos grasos de los tejidos vegetales es evidente que debe existir una regulación sobre la síntesis de ácidos grasos y su desaturación a través de mecanismos específicos de tejido.

Un ejemplo de la regulación de las desaturasas con el desarrollo es la expresión de la desaturasa soluble de *Ricinus communis* (ricino). Esta desaturasa es una enzima fundamental en la biosíntesis de ácidos grasos, y parece estar regulada de manera diferencial en los diferentes tejidos de la planta. La clonación de este gen en *Ricinus communis* (ricino) permitió observar que los niveles de mRNA eran mayores en semillas en desarrollo que en hojas o raíces (Shanklin y Somerville, 1991). Esta observación fue comprobada posteriormente mediante la expresión del promotor de la Δ -9 esteroil-ACP desaturasa de *Brassica napus* (colza) en *Nicotiana tabacum* (tabaco), aunque en este caso también se detectó la expresión en otros tejidos de marcado carácter oleosintético, como las semillas en desarrollo o los granos de polen (Slocombe y col., 1994). Un estudio más reciente que utiliza también la expresión del promotor del gen de palma en *Lycopersicum esculentum* (tomate) únicamente detecta su expresión en frutos maduros (Taha y col., 2012). Parece ser que existe regulación a nivel transcripcional de esta enzima en tejidos claramente

responsables de la síntesis de ácidos grasos y lípidos como son las semillas. Sin embargo la síntesis *de novo* de ácidos grasos en plantas que ocurre en los plastidios durante la mayoría de los estadios de desarrollo de la planta, requiere de la actividad de esta enzima. Esto sugiere que quizá exista un control post-transcripcional que regula su actividad en el resto de tejidos vegetales.

Otro caso de regulación de las desaturasas por desarrollo es el de las ω -6 desaturasas del retículo endoplásmico. Por ejemplo, para las desaturasas reticulares de tipo FAD2 se ha descrito que los niveles de expresión más altos se encuentran en semillas (Heppard y col., 1996 ; Martinez Rivas y col., 2001 ; Tang y col., 2005). En el trabajo de Heppard y col., (1996), el aislamiento de dos genes *FAD2* en soja (*GmFAD2-1* y *GmFAD2-2*) y el estudio de su expresión relativa permitió observar sus diferencias en cuanto al patrón de expresión. El gen *GmFAD2-2* se expresaba de modo constitutivo y sin embargo, el gen *GmFAD2-1* presentaba una elevada expresión en semillas en desarrollo, relacionando a esta isoforma con la conversión de 18:1 a 18:2 en este tejido (Heppard y col., 1996). Posteriormente el aislamiento de isoformas del gen *FAD2* en *Helianthus annuus* (girasol) permitió confirmar la observación de que únicamente algunas de estas isoformas (tipo *FAD2-1*) poseen un patrón de expresión claro en semillas (Martinez Rivas y col., 2001). En este trabajo se mostraba que la expresión de dos isoformas del gen en girasol (*HaFAD2-2* y *HaFAD2-3*) era constitutiva, y sin embargo la del gen *HaFAD2-1* era específica de embriones en desarrollo. La alta expresión del gen *HaFAD2-1* en este tejido, ocurría en plantas de fenotipo normal y sin embargo estaba inhibida en plantas con fenotipo alto-oleico (con elevados niveles de 18:1), lo cual evidenciaba la dependencia de la expresión de este gen con la presencia de la mutación (Martinez Rivas y col., 2001). Un trabajo posterior mostraba el aislamiento de otro gen tipo *FAD2-1* en soja *GmFAD2-1B* (adicionalmente al aislado por Heppard y col., (1996) *GmFAD2-1* o *GmFAD2-1A*) y proponía que la fosforilación

del residuo Serina-185 de las desaturasas tipo FAD2-1 podría ser un mecanismo de regulación de estas enzimas que provocaría la disminución de su actividad (Tang y col., 2005).

El caso de las ω -3 desaturasas se tratará de manera más ampliada en el capítulo 1 de resultados “Estudio de la regulación de las ω -3 desaturasas durante el desarrollo de la hoja”.

1.5. TRANSPORTE DE LÍPIDOS ENTRE MEMBRANAS

La composición de lípidos de membrana de una planta es variable y se ve afectada por factores como el desarrollo del tejido, la sequía, la salinidad o el frío. Además de éstos, la deficiencia de fósforo es uno de los condicionantes ambientales más comunes que también provoca variaciones en la composición de lípidos de membrana (Shimajima, 2011). El intercambio dinámico de lípidos entre membranas de una célula vegetal debe ser un proceso natural e indispensable para el correcto desarrollo de la planta. De hecho, algunos estudios recientes han demostrado que sin el transporte de lípidos entre membranas la viabilidad de las semillas está impedida (Xu y col., 2005 ; Xu y col., 2008).

Los coeficientes de permeabilidad de los ácidos grasos de cadena larga en membranas sintéticas compuestas únicamente por lípidos son relativamente altos, lo cual sugiere que la difusión simple podría ser un método de transporte de lípidos entre membranas (Kamp y Hamilton, 2006). Sin embargo, la composición lipídica es diferente entre tejidos vegetales y característica de cada tipo de membrana celular. Así los galactolípidos se encuentran principalmente en los cloroplastos y únicamente se hallan en las membranas extraplastidiales en condiciones de deficiencia de fósforo (Dörmann y Benning, 2002 ; Benning y Ohta, 2005). La

particular localización de determinados glicerolípidos en las membranas celulares vegetales sugiere que existe un control sobre su movimiento; lo cual sería incoherente con un movimiento de éstos únicamente debido a la difusión. En cualquier caso, la actividad de ciertas enzimas como las tioesterasas o las acil-CoA sintetetasas de cadena larga debe estar implicada (Benning, 2009). De las evidencias experimentales extraídas de los numerosos experimentos de marcaje radiactivo y de los mutantes de *Arabidopsis*, se deduce que deben existir diferentes tipos de transporte de lípidos entre membranas que se detallarán a continuación.

1.5.1. Transporte de ácidos grasos fuera del cloroplasto

Durante su síntesis, los ácidos grasos que se incorporan a la ruta eucariota, abandonan el cloroplasto como derivados acil-CoA y se incorporan a los lípidos en el retículo endoplásmico. Esto hace evidente que debe existir un mecanismo de transporte de éstos lípidos del cloroplasto al retículo. Para éste proceso es necesaria la actividad acil-CoA sintetasa (ACS), implicada en la formación de un enlace tioéster entre el ácido graso y el Coenzima A. La existencia de actividad ACS en envueltas de cloroplasto se conoce hace tiempo (Roughan y Slack, 1977 ; Joyard y Stumpf, 1981). Ésta se ha localizado en la envuelta externa del cloroplasto (Andrews y Keegstra, 1983 ; Block y col., 1983a). Se han realizado estudios con una familia concreta, las acil-CoA sintetetasas de cadena larga (LACS). Éstas se han relacionado tradicionalmente con el transporte de lípidos en otras especies como bacterias (*Escherichia coli*), levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*) ó mamíferos (*Homo sapiens*) revisado en Black y DiRusso, (2003). En *Arabidopsis*, se han encontrado 9 homólogos de éstas proteínas (LACS 1-9) y todas ellas eran funcionales en lisados de levaduras (Shockey y col., 2002).

Los patrones de expresión de los diferentes genes LACS en tejidos *Arabidopsis* y la localización de estas enzimas llevó a pensar en LACS9 como candidata para la

actividad plastidial (Schnurr y col., 2002). De hecho, los ensayos con cloroplastos aislados del mutante *lacs9-1* demostraron que LACS9 es la enzima que más contribuye a la actividad LACS en cloroplastos. Sin embargo, la línea mutante *lacs9-1* no presenta alteraciones en los lípidos totales de las hojas con respecto a la línea silvestre (Schnurr y col., 2002). Así pues, no se puede descartar la actividad de otras enzimas (LACS o no) que participen en éste proceso.

1.5.2. Transporte de lípidos del retículo endoplásmico al cloroplasto

La identificación a lo largo de los últimos años de los mutantes trigalactosil-diacilglicerol (*tgdl*) en *Arabidopsis*, ha esclarecido un mecanismo de transporte de lípidos del retículo endoplásmico al cloroplasto (Xu y col., 2005 ; Awai y col., 2006 ; Lu y col., 2007 ; Xu y col., 2008). Todos los mutantes *tgdl* poseen fenotipos similares, crecimiento reducido y acumulación de lípidos como PA, oligogalactolípidos o TAG (en gotas lipídicas en el citoplasma). Según estos estudios, las proteínas TGD1-3 formarían un complejo multiproteico encargado de transportar PA desde la envuelta interna al estroma del cloroplasto. Sin embargo, la interacción entre estas tres proteínas no ha sido demostrada. La acumulación de PA se debe a la incapacidad de éstos mutantes de incorporarlo al cloroplasto para la síntesis de galactolípidos (Xu y col., 2005). Se ha demostrado que TGD4 une PA *in vitro* y se localiza en la envuelta externa del cloroplasto, allí probablemente facilita su incorporación al cloroplasto (Wang y col., 2012). La baja viabilidad de las semillas obtenidas de éstos mutantes hace pensar que éste transporte es necesario e insustituible para el correcto desarrollo vegetal (Xu y col., 2005).

1.5.3. Transporte de lípidos del cloroplasto al retículo endoplásmico

Este tipo de transporte de lípidos entre membranas se hace evidente en mutantes de *Arabidopsis* como el mutante *fad2* (deficiente en la ω -6 desaturasa reticular) (Miquel y Browse, 1992). En este mutante, el análisis de ácidos grasos muestra que la cantidad de 18:3 en lípidos extraplastidiales es bastante parecida a la de la línea silvestre. Sin embargo, el nivel de 18:1 total en este mutante es muy elevado y el de 18:2 muy bajo, datos que son consistentes con la mutación. El mantenimiento de los niveles de 18:3 en lípidos extracloroplásticos sugiere la transferencia de éstos desde el cloroplasto hacia las membranas extraplastidiales mediante un mecanismo totalmente desconocido. Este tráfico de lípidos entre membranas puede existir en condiciones normales en una planta de la línea silvestre, pero se pone de manifiesto en este mutante.

Otra situación en la que hay evidencia de transporte de lípidos fuera del cloroplasto es la deficiencia de fosfato (Dörmann y Benning, 2002). Esta deficiencia provoca la salida de galactolípidos del cloroplasto a las membranas extraplastidiales, permitiendo el uso más eficiente del fósforo por las células vegetales. En deficiencia de fosfato se observa un descenso de los niveles de fosfolípidos y un aumento en los niveles de DGDG y SQDG. El aumento en los niveles de SQDG parece destinado a sustituir parcialmente la función del PG cloroplástico (Nakamura, 2013). El DGDG sintetizado en la deficiencia de fosfato es transportado a las membranas extraplastidiales para sustituir a los fosfolípidos (Nakamura, 2013).

También se ha descrito la presencia del ácido graso 16:3 (típicamente de la ruta procariota) en lípidos extracloroplásticos (sintetizados enteramente por la ruta eucariota) en el mutante *tgdl* (Xu y col., 2005). Todos estos hechos ponen de

manifiesto que existe un flujo de lípidos (o ácidos grasos) desde el cloroplasto hacia las membranas extraplastidiales, aunque actualmente se desconoce su mecanismo molecular.

1.5.4. Transporte de lípidos desde la envuelta interna del cloroplasto al tilacoide

Los tilacoides son las membranas más abundantes en las células vegetales fotosintéticas. Las envueltas del cloroplasto son el lugar donde se han localizado la mayoría de enzimas responsables de la biosíntesis de galactolípidos. Por tanto, la formación de membranas tilacoidales funcionales requiere la existencia de un flujo de galactolípidos desde la envuelta hacia el tilacoide, así como el importe de proteínas al interior del cloroplasto (Dörmann y Benning, 2002). Algunas evidencias sugieren que este proceso ocurre a través de la formación y transporte de vesículas (Morre y col., 1991) y de un modo dependiente de la temperatura (Andersson y col., 2001). La obtención de un mutante de *Arabidopsis* denominado *vipp1* (vesicle-inducing protein in plastids) (Kroll y col., 2001) que carece de la formación de éstas vesículas y también del desarrollo de membranas tilacoidales apoya la hipótesis de la participación de ésta proteína en la formación de éstas membranas. La existencia de un mutante análogo en *Synechocystis* (Westphal y col., 2001) confirma que éste proceso es común en la naturaleza, y aporta una prueba más a la teoría endosimbionte de los cloroplastos (Margulis, 1996).

1.5.5. Otros tipos de transporte

Las proteínas de transporte de lípidos (LTPs) constituyen una familia de pequeñas proteínas que son capaces de unir ácidos grasos y realizar *in vitro* el intercambio de fosfolípidos entre membranas (Kader, 1985). Hasta el momento se han descrito 15 miembros de esta familia de proteínas en *Arabidopsis* (Arondel y

col., 2000) y la mayoría se han localizado en el espacio extracelular. Las LTPs se han relacionado con diferentes procesos que se desarrollan en la planta como el ensamblaje y deposición de las ceras (Hollenbach y col., 1997 ; DeBono y col., 2009), la adhesión del tubo polínico (Park y Lord, 2003 ; Chae y col., 2009), la movilización de lípidos de almacenamiento en semillas (Tsuboi y col., 1992) o la señalización celular (Buhot y col., 2001). Algunos trabajos también las localizan en el interior de la célula (Carvalho y col., 2004 ; Diz y col., 2011) pero se desconoce la función que podrían desarrollar allí.

La presencia de PC (lípidos derivados de la ruta eucariota), en las envueltas del cloroplasto planteó la hipótesis de que ésta fuera la molécula que se intercambia entre el retículo y el cloroplasto. Se ha descrito que la forma monoacilada de PC (lyso-PC) es capaz de abandonar el retículo y llegar al cloroplasto donde se transforma en PC. Las enzimas responsables de éste tráfico han sido localizadas en las membranas adecuadas haciendo factible ésta hipótesis (Bessoule y col., 1995). Adicionalmente, los experimentos de marcaje radiactivo también confirmarían ésta hipótesis (Mongrand y col., 2000).

En *Arabidopsis*, una planta 16:3, se ha identificado una molécula transportada entre membranas, el PA (Wang y col., 2012). A su vez en *Allium porrum* (puerro), una planta 18:3, se ha visto que la molécula transportada es PC (Mongrand y col., 2000). El PA es producido por ambas rutas de biosíntesis que son funcionales al 50 % en *Arabidopsis* y la PC es producida por la ruta eucariota, la principal y mayoritaria en plantas 18:3 como el puerro. Dada la posición de estas dos moléculas en los dos tipos de rutas de síntesis de lípidos en plantas, tanto PA como PC son excelentes candidatas para el intercambio al menos en condiciones control.

Por otro lado el descubrimiento de zonas de contacto entre las membranas de los diferentes orgánulos de la célula vegetal abre una nueva perspectiva en cuanto

al intercambio intracelular de lípidos. Las zonas de contacto entre el retículo endoplásmico y la membrana externa de los cloroplastos (PLAMs) suponen una alternativa a valorar junto a las hipótesis sobre el transporte de lípidos descritas hasta el momento (Andersson y col., 2007). La identificación de genes que codifican para enzimas flipasas de fosfolípidos en *Arabidopsis thaliana* (Aminophospholipid ATPasas, ALAs) también podría estar relacionada con ello (Sebastian y col., 2012). La demostración de la existencia de estas zonas de contacto se muestra en la figura 1.13, extraída de (Andersson y col., 2007).

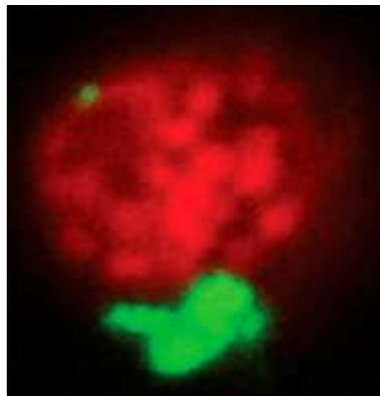


Figura 1.13 Imagen de microscopía confocal de cloroplastos aislados de plantas de Arabidopsis que sobreexpresaban en el retículo endoplásmico la proteína fluorescente verde (GFP).

Extraída de (Andersson y col., 2007).

2. SITUACIÓN ACTUAL Y RETOS

Los aceites obtenidos de cultivos vegetales son uno de los principales productos de la práctica agrícola. Su utilización está en auge, ya que la producción de éstos se ha triplicado en los últimos 20 años y se espera que se duplique desde ahora a 2030 (Chapman y Ohlrogge, 2012). Los aceites vegetales, se producen principalmente para la alimentación humana, pero ha aumentado su uso en la industria química para la síntesis de multitud de productos (biodiesel, pinturas, lubricantes, cosméticos, detergentes, plásticos, resinas...). Esto es debido al encarecimiento del precio del petróleo, la concienciación sobre el impacto del uso de combustibles fósiles y la necesidad de desarrollar fuentes renovables de combustible y material industrial (Somerville, 2007 ; Dyer y col., 2008). En consecuencia, la manipulación del contenido en ácidos grasos de especies vegetales se vuelve un tema de interés creciente a nivel mundial. A continuación se detallarán brevemente algunos de los retos sobre los que se está trabajando en la actualidad en el campo de los lípidos vegetales para mostrar la situación actual y poner de manifiesto la necesidad de conocimiento a nivel básico en estos temas.

2.1. PRODUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS BENEFICIOSOS PARA LA SALUD EN PLANTAS

La producción de aceites de origen vegetal posee una ventaja frente a la de otras biomoléculas. Su condición de lípidos neutros hace que posean un bajo efecto como osmolitos; y esto permite, en teoría, su almacenaje en altas concentraciones dentro de las células (Somerville y col., 2000a ; Somerville y Bonetta, 2001). La semilla, al funcionar como un sistema de acumulación, es el tejido de mayor concentración de lípidos y sobre el que se centran los estudios de producción (Mifflin y col., 1999).

Unos de los retos de estas investigaciones es la obtención de especies vegetales con alto contenido en ácidos grasos beneficiosos para la salud humana. Son los denominados ω -3 y ω -6 de cadena larga, el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5) y el ácido docosapentaenoico (DHA, 22:6). Estos ácidos grasos son esenciales para el correcto desarrollo humano y los seres humanos, como otros animales, necesitamos de su ingesta directa o de la de sus precursores como el ácido α -linolénico (ALA, 18:3) (Venegas-Calcrón y col., 2010). Sin embargo, los seres humanos sólo transformamos alrededor de un 5 % del 18:3 ingerido en EPA y un 0,5 % en DHA (Williams y Burdge, 2006), convirtiendo la inclusión en la dieta de EPA y DHA en una necesidad. La ingesta habitual de estos ácidos grasos deriva en parte de la pesca de atún o verdel, la cual plantea el problema directo de la sobreexplotación marina. Una segunda fuente es la producción de pescados en piscifactorías. Los ácidos grasos ω -3 y ω -6 de cadena larga que poseen éstos, son incorporados a través de su dieta (a través de aceites de pescado) haciendo que el proceso de producción sea insostenible. La obtención de especies vegetales productoras de EPA y DHA supone, por tanto, una alternativa sostenible. Los precursores del EPA y del DHA son el ácido linoleico (LA, 18:2) y el ácido α -linolénico (ALA, 18:3) presentes en diferentes cantidades en la mayoría de las especies vegetales. La mayoría de las plantas sólo sintetizan hasta 18:3 debido a la ausencia de enzimas posteriores de la ruta y solo existen algunas especies que son capaces de producir los siguientes intermedios de síntesis, el ácido γ -linolénico (GLA, 18:3) y el ácido estearidónico (SDA, 18:4), entre ellas se encuentra la borraja (*Boragus officinalis*). Desafortunadamente, dado su bajo uso agronómico y su baja producción de aceite los estudios no se centran en estas especies.

El estudio de las rutas de síntesis de EPA y DHA en otras especies (hongos, mamíferos,...) permitió identificar los genes responsables de la producción de estos ácidos grasos. Posteriormente, la expresión coordinada de estos genes en levaduras

puso de manifiesto la viabilidad de ésta aproximación (Beaudoin y col., 2000 ; Das y col., 2000 ; Parker Barnes y col., 2000 ; Domergue y col., 2002 ; Meyer y col., 2004). Actualmente, la expresión de éstos genes bajo los efectos de promotores específicos de semilla lleva a la acumulación de éstos ácidos grasos en éste tejido en diferentes porcentajes dependiendo de la especie huésped (Abbadi y col., 2004 ; Napier, 2007). En éstos momentos, los estudios se centran en la optimización de las rutas de síntesis de éstos ácidos grasos evitando en la medida de lo posible la acumulación de intermediarios (Ruiz Lopez y col., 2012).

2.2. PRODUCCIÓN DE MATERIAS PRIMAS DE USO INDUSTRIAL (BIODIESEL)

Otro gran reto en la producción de aceites vegetales lo supone la producción de materias primas de uso industrial y de entre ellas, el biodiesel es la de mayor relevancia. Nuestra sociedad depende en gran medida del petróleo que se utiliza en un 90 % como fuente de energía. El resto es utilizado por las industrias químicas y petroquímicas como materia prima en la síntesis de productos como solventes, lubricantes y plásticos (Carlsson, 2009). Al ser el petróleo una fuente de energía no renovable, su precio incrementará cuando las reservas lleguen a su fin. Existen diferentes opiniones sobre la cantidad disponible de éste combustible fósil (Somerville, 2007), aunque se estima que ya se ha llegado a consumir la mitad de las reservas mundiales y que el precio del crudo aumentará conforme desciendan los niveles disponibles. Además, es un hecho ampliamente aceptado que la emisión de cantidades crecientes de CO₂ supone un grave problema medioambiental, y el uso de biocombustibles podría ayudar a mitigar este problema. El CO₂, es un gas de efecto invernadero que se acumula en la atmósfera provocando un aumento de la temperatura media de la Tierra produciendo el denominado calentamiento global, que tiene consecuencias directas sobre el medio ambiente y los seres vivos, tales

como el deshielo de los polos o el incremento del nivel del mar (García Soto y col., 2012). Los ácidos grasos mayoritarios en los aceites vegetales son el palmítico (16:0), esteárico (18:0), oleico (18:1), linoleico (18:2) y linolénico (18:3), además del láurico (12:0) en aceites como los de coco y palma. A pesar de las diferencias en la longitud de cadena y en el grado de insaturación, la similitud estructural entre los hidrocarburos derivados del petróleo y los ácidos grasos derivados del aceite vegetal convierte a éstos últimos en excelentes candidatos para sustituirlo. Los aceites vegetales son demasiado viscosos para su uso directo como biocombustibles, así que se tratan para convertirlos en ésteres de ácidos grasos. La ratio energética inversión/producción (entendida como energía invertida en generar el cultivo vegetal/ energía obtenida del mismo) como productor de biodiesel es de 1:2 ó incluso 1:4 en el caso de cultivos de secano (Dyer y col., 2008). Algunas de las ventajas del biodiesel son que en la combustión emite menos monóxido de carbono (CO) y menos partículas (Graboski y McCormick, 1998). Además también produce menos contaminantes como los compuestos sulfurados y aromáticos, éstos últimos además considerados carcinogénicos (Durrett y col., 2008). La principal ventaja del uso del biodiesel es que en principio su producción es sostenible, lo cual se debe a que la energía necesaria para la formación de los enlaces que componen los ácidos grasos vegetales proviene en último lugar del Sol. Sin embargo, el biodiesel tiene actualmente también algunas desventajas, pues produce mayores cantidades de óxido nítrico, como fluido tiene baja adaptación al frío y sus componentes tienen mayor nivel de oxidación que el combustible habitual. El mayor inconveniente en su uso, sin embargo es el elevado coste del aceite de partida (llegando a ser un 88 % del coste total de producción). Una de las razones del elevado coste del material de partida es la competitividad creada entre el mercado alimenticio y el industrial, al utilizar cultivos como la soja para la producción de biodiesel (Durrett y col., 2008). Este hecho debe tenerse en cuenta en el desarrollo de este tipo de productos, para

que la producción de biodiesel no sustituya a los cultivos vegetales destinados a la alimentación (Durrett y col., 2008).

Es por esto que uno de los retos más importantes en éste campo consiste en el estudio de especies oleaginosas no consumibles adaptadas a diferentes hábitats. Los estudios más recientes señalan a la especie *Jatropha curcas* como una gran candidata para la producción de biodiesel (Carlsson, 2009). Otra solución a la producción de aceites para biodiesel es el cultivo de microalgas, aunque en este campo se tienen que realizar avances significativos en el diseño de biorreactores para la producción a gran escala (Hu y col., 2008). Además en la actualidad se investiga la obtención simultánea de otros productos además del biodiesel, para incrementar la eficiencia de producción (He y col., 2011).

Sin embargo, cualquier avance biotecnológico en cualquiera de estos campos requiere del conocimiento básico de las rutas de síntesis y almacenamiento de los ácidos grasos, lípidos y fitohormonas derivadas de los mismos (Somerville y Browse, 1991 ; Somerville y Bonetta, 2001). En numerosas ocasiones, los intentos de modificación de las rutas de biosíntesis de ácidos grasos en plantas se ven frustrados por la complejidad de las reacciones que intervienen en las mismas. Además, el estudio de los lípidos requiere en muchos casos el trabajo con proteínas de membrana, siendo la capacidad de análisis de las mismas bastante reducida. Su purificación es tediosa o imposible y los datos bioquímicos son escasos: en muchos casos se desconoce su localización e incluso el gen o genes que codifican para esa actividad.

De éste modo se hace necesario el estudio básico de las rutas de síntesis de ácidos grasos, de la identificación y localización de las enzimas implicadas en las mismas y del estudio de sus mecanismos de regulación y de respuesta a diferentes estreses. En éste marco se engloba el estudio realizado durante ésta Tesis Doctoral.

3. OBJETIVOS

3.1. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ω -3 DESATURASAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA HOJA EN SOJA

3.2. LOCALIZACIÓN, ORGANIZACIÓN Y REGULACIÓN DE LAS ω -6 y ω -3 DESATURASAS PLASTIDIALES

3.3. ESTUDIO DE LA OXILIPINA α -N-OPDA COMO FITOHORMONA PRECURSORA DEL ÁCIDO JASMÓNICO

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS ω -3 DESATURASAS DURANTE EL DESARROLLO DE LA HOJA EN SOJA

Tal y como se menciona en la introducción la composición de lípidos de membrana en plantas es variable y se ve afectada por diversos factores como el desarrollo vegetal (Horiguchi y col., 1998 ; Yamaoka y col., 2011 ; Coulon y col., 2012), el estrés osmótico (Heilmann, 2009 ; Hong y col., 2010), la temperatura (O'Quin y col., 2010), el estrés por patógenos (Testerink y Munnik, 2011) o la deficiencia de fosfato (Shimajima, 2011).

Un primer objetivo de esta Tesis Doctoral consistió en analizar la contribución de las ω -3 desaturasas reticulares y plastidiales a la producción de ácido graso linolénico (18:3) durante el desarrollo de la planta en soja. Concretamente, se estudió la expresión durante la germinación de las semillas y principalmente durante el desarrollo de las hojas en plantas, ya que en ambos tejidos la síntesis de ácidos grasos es muy relevante. Dados los resultados obtenidos, se decidió utilizar también cultivos líquidos de células fotosintéticas de soja para poder así comparar los resultados con los de hojas en desarrollo.



Figura 4.1 Diferentes tejidos vegetales en plantas de soja.

En la figura 4.2 se muestran varias imágenes de diferentes etapas del desarrollo de las hojas en soja.



Figura 4.2 Imágenes de hojas de soja en desarrollo. (A) Recién abiertas (RA). (B) 3 días de desarrollo. (C) 7 días de desarrollo. (D) 14 días de desarrollo. (E) 18 días de desarrollo.

Sabemos que, de forma general, el nivel de ácido linolénico (18:3) aumenta durante el desarrollo de las hojas en la mayoría de las especies vegetales. Este es el

caso del maíz (Leech y col., 1973), el trigo (Horiguchi y col., 1996a ; Horiguchi y col., 1998) o de *Arabidopsis* (Horiguchi y col., 1996b). En otras especies tales como la alfalfa (Klopfenstein y Shigley, 1967) o el tabaco (Koiwai y col., 1981), se detectó una disminución de los niveles de 18:3, aunque en estos casos esta disminución podría estar relacionada con la senescencia de la hoja (Koiwai y col., 1981).

El incremento de los niveles de 18:3 durante el desarrollo de la hoja se ha relacionado con la producción de membranas tilacoidales. Esto se debe a que el 18:3 se encuentra preferencialmente en los galactolípidos cloroplásticos MGDG y DGDG en todas las etapas del desarrollo de la hoja (Horiguchi y col., 1996b). La acumulación de 18:3 implica que existe actividad ω -3 desaturasa (reticular y/o plastidial) en todas las etapas del desarrollo de la hoja. Sin embargo, a pesar de la relevancia del proceso, los mecanismos moleculares de regulación de esta actividad no han sido estudiados en detalle hasta el momento.

El único trabajo que recoge la expresión de las ω -3 desaturasas *FAD3* y *FAD7* (reticular y plastidial, respectivamente) durante el desarrollo de la hoja es el realizado en trigo, una planta monocotiledónea por Horiguchi y col., (1998). Merece la pena mencionar que en este trabajo, no se analiza la expresión relativa de *TaFAD8* ya que se ha considerado siempre una desaturasa inducible por frío que no es funcional a temperatura ambiente (Gibson y col., 1994 ; McConn y col., 1994). Desafortunadamente, no hay más datos de expresión de las ω -3 desaturasas durante el desarrollo de la hoja en otras especies y, particularmente en dicotiledóneas, no se ha realizado ningún estudio experimental probablemente porque el patrón de desarrollo de sus hojas es más complicado. En las hojas de las plantas dicotiledóneas ocurre simultáneamente la división y la elongación celular en diferentes áreas de las mismas (Tsukaya, 1995) mientras que en monocotiledóneas, la división celular ocurre en el meristemo basal de la hoja,

generándose un gradiente lineal de edad celular desde la base hasta el ápice de la misma (Leech y col., 1973 ; Mullet, 1988).

En el trabajo realizado durante esta Tesis Doctoral se ha estudiado la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados (especialmente 18:2 y 18:3) y los perfiles de expresión de los genes de las ω -3 desaturasas en soja [*Glycine max* (cv. Volania)], una especie dicotiledónea.

4.1.1. Composición de ácidos grasos totales durante el desarrollo de la hoja en soja

Como primer paso en este estudio, analizamos la composición de ácidos grasos procedentes de lípidos totales en hojas de soja durante el desarrollo de la hoja. Los resultados se muestran en la figura 4.3.

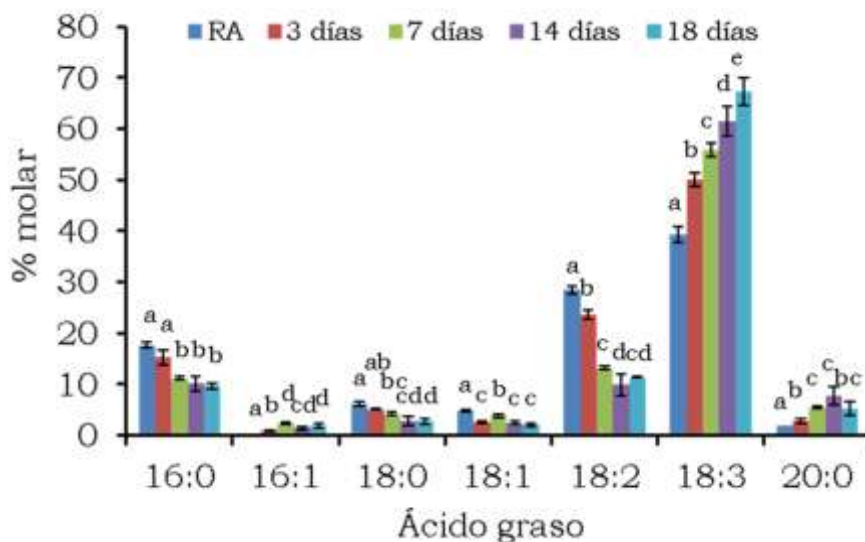


Figura 4.3 Composición de ácidos grasos de lípidos totales durante el desarrollo de hojas trifoliales de soja. Las barras azul oscuro indican los ácidos grasos de hojas recién abiertas (RA). Las rojas se corresponden con las hojas de 3 días, las verdes con las de 7 días, las moradas con las de 14 días y las azul claro con las de 18 días. Para cada ácido graso, letras diferentes indican diferencias significativas entre puntos de muestra ($P < 0.05$).

Como se observa en la figura 4.3, el perfil de ácidos grasos totales en hojas de soja es el característico de una planta 18:3, con ausencia de 16:3 y altos niveles de ácidos grasos de 18 átomos de carbono. Los ácidos grasos poliinsaturados fueron mayoritarios durante todos los estadios de desarrollo y de ellos, la especie más abundante fue el ácido linolénico (18:3). Cabe destacar que el nivel de 18:3 en hojas recién abiertas (RA) era aproximadamente de un 40%, indicando que la actividad desaturasa está presente en los estadios más tempranos de desarrollo de la hoja. Como también se puede observar en la figura 4.3, los niveles de 18:3 aumentaron con el desarrollo de la hoja. Desde un 40 % en hojas recién abiertas (RA) hasta un 70 % en hojas de 18 días (Figura 4.5). Un análisis por cromatografía de capa fina (TLC) demostró que el 18:3 se encontraba principalmente esterificado a MGDG y DGDG tal y como se ha demostrado en muchas otras especies, lo que sugiere que gran parte del 18:3 sintetizado durante el desarrollo de la hoja se incorpora a los glicerolípidos cloroplásticos para formar las membranas tilacoidales.

4.1.2. Análisis de clorofila total y proteína D1 durante el desarrollo de las hojas de soja

Con objeto de establecer una mayor correlación entre el aumento de 18:3 y la formación de membranas tilacoidales, decidimos estudiar la acumulación de pigmentos y de proteínas relacionados con la actividad fotosintética. Concretamente se estudió la acumulación de clorofila total y de proteína D1 durante el desarrollo de las hojas trifoliales.

El análisis de clorofila total en hojas de soja en desarrollo se muestra en la figura 4.4.

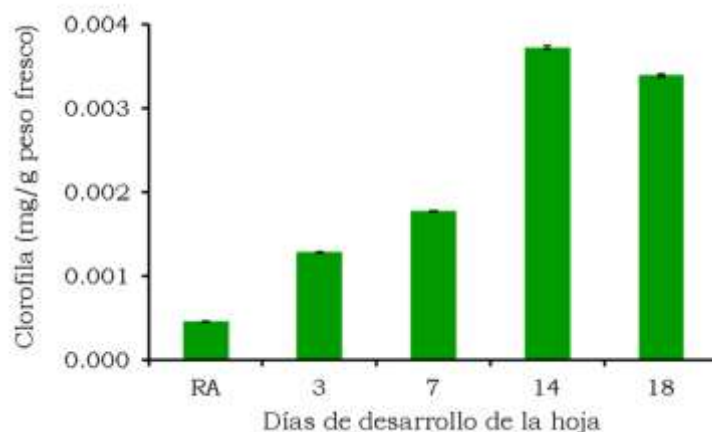


Figura 4.4 Análisis de clorofila total en hojas de soja recién abiertas (RA), de 3 días, 7 días, 14 días y 18 días.

Como se puede observar en la figura 4.4, la clorofila total aumentó durante el desarrollo de la hoja, aunque en el estadio de 18 días se observa un ligero pero significativo descenso con respecto a los 14 días. Éste podría corresponderse con un inicio de la senescencia foliar. Para correlacionar el incremento de 18:3 con la formación de membranas tilacoidales durante el desarrollo de la hoja, también se analizó la acumulación de proteína D1 a lo largo de este proceso. D1 es una de las subunidades proteicas del centro de reacción del fotosistema II (Mattoo y col., 1984) que se localiza en los tilacoides y se correlaciona directamente con la síntesis de membranas tilacoidales. En la figura 4.5 se muestra la acumulación de proteína D1 (respecto a proteína total) observada durante el desarrollo de las hojas trifoliales en soja.

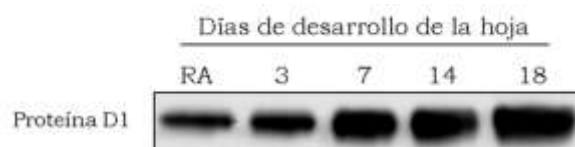


Figura 4.5 Acumulación de proteína D1 en hojas trifoliales de soja recién abiertas (RA), de 3 días, 7 días, 14 días y 18 días. La proteína D1 se detectó mediante western blot y

quimioluminiscencia con el anticuerpo comercial AntiPsbA de Agrisera utilizando extractos de proteína total de hojas trifoliales de soja. Para este experimento se cargaron 3 µg de proteína total en cada carril.

Tal y como se observa en la figura 4.5, el análisis por western blot de D1 mostró una banda de peso molecular (35-36 kDa) correspondiente al monómero de D1. En la figura 4.5 se puede observar que se encuentra proteína D1 incluso en los estadios más tempranos de desarrollo de la hoja, lo cual es coherente con el alto reemplazo de esta proteína con la luz (Mattoo y col., 1984 ; Alfonso y col., 2004). Como se observa en la figura 4.5, la cantidad relativa de proteína D1 aumentó durante el desarrollo de la hoja, indicando junto al resto de información aportada en este aspecto, que el aumento de 18:3 durante el desarrollo de la hoja en soja se correlaciona directamente con la biosíntesis de membranas tilacoidales.

4.1.3. Expresión de las ω -3 desaturasas durante el desarrollo de las hojas de soja

La expresión de las ω -3 desaturasas se analizó mediante PCR semicuantitativa. La utilización de otra técnica como la PCR cuantitativa (qPCR) en este caso se vió limitada por el número de genes de cada una de ellas (cuatro genes FAD3, dos genes FAD7 y dos genes FAD8), así como la elevada homología a nivel de secuencia entre todas ellas (>76 % entre miembros de la misma familia), todo lo cual dificultaba el diseño de cebadores específicos para cada gen en las condiciones de la qPCR, que requiere temperaturas de hibridación más restrictivas además de la limitación en cuanto al tamaño del amplicón.

En la figura 4.6 se muestra la expresión de los genes que codifican las ω -3 desaturasas de soja durante el desarrollo de la hoja.

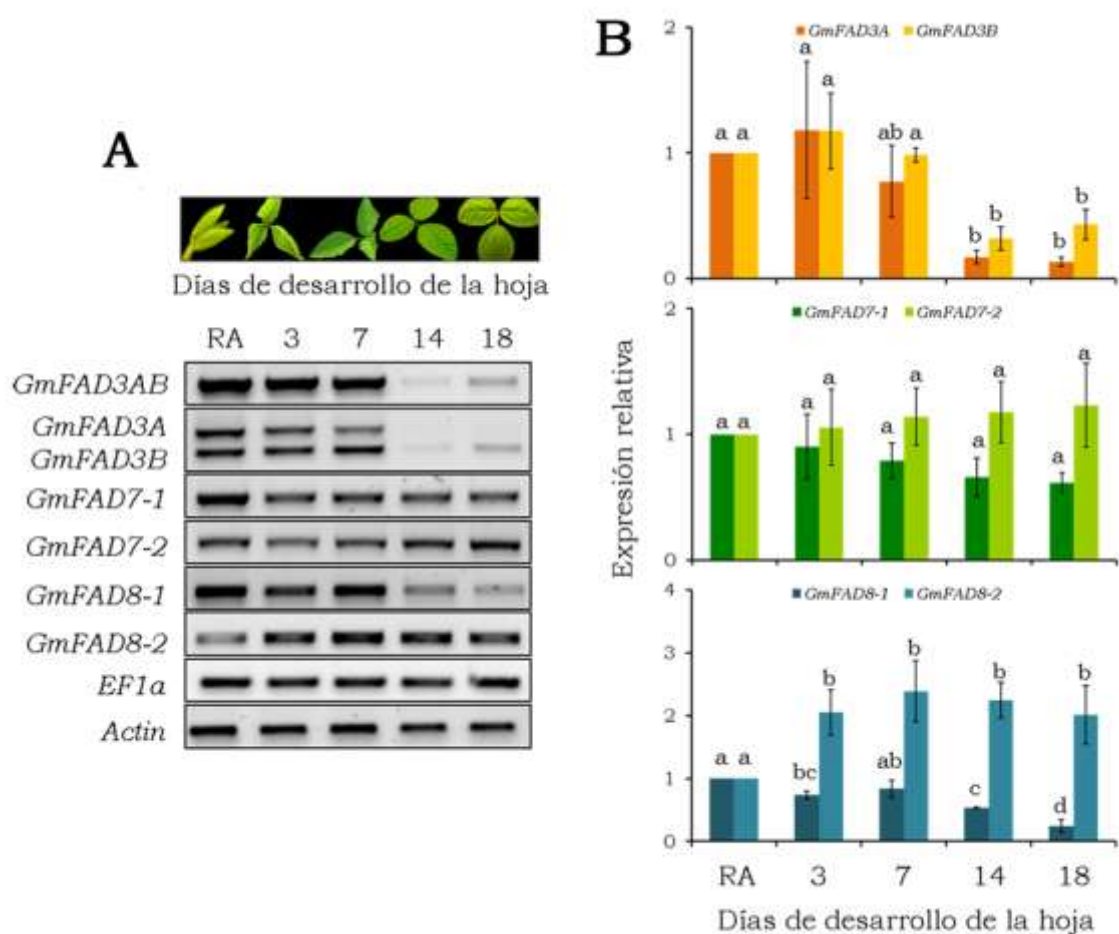


Figura 4.6 Expresión de los genes que codifican para las ω -3 desaturasas en hojas recién abiertas (RA), de 3 días, 7 días, 14 días y 18 días de soja. Los genes de la actina y EF1 α se utilizaron como genes de referencia. (A) RT-PCR semicuantitativa de uno de los experimentos de desarrollo en hojas de soja. (B) Representación de la media y desviación estándar de la expresión relativa de las bandas de PCR obtenidas en las diferentes réplicas biológicas. Para cada gen, letras diferentes indican diferencias significativas entre los puntos ($P < 0.05$).

Como se observa en la figura 4.6, los genes correspondientes a las ω -3 desaturasas reticulares *GmFAD3A* y *GmFAD3B* se expresaban en todos los estadios de desarrollo de la hoja (figura 4.6-A). Sin embargo, los niveles de ambos transcritos decrecían con el desarrollo de la hoja, llegando casi a desaparecer a los 18 días. El

análisis por digestión de los productos de PCR con *Van91I* que permite diferenciar *GmFAD3A* de *GmFAD3B*, reveló que el transcrito correspondiente a *GmFAD3A* decrecía más rápidamente que el correspondiente a *GmFAD3B* (Figura 4.6-B).

Con respecto a los genes de las ω -3 desaturasas plastidiales hay que señalar que todos se expresaban en los diferentes estadios de desarrollo de la hoja, aunque los perfiles de expresión de cada una mostraban diferencias entre sí. Como se puede observar en la figura 4.6-B, los niveles de expresión de las ω -3 desaturasas *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* no variaban de manera significativa durante el desarrollo de la hoja. Sin embargo, los transcritos correspondientes a las dos isoformas de FAD8 mostraron un comportamiento contrario, mientras el nivel de transcrito de *GmFAD8-1* disminuía secuencialmente con el desarrollo de la hoja, el del transcrito *GmFAD8-2* aumentaba a los 3 días de desarrollo, manteniéndose a esos niveles durante el resto de estadios analizados (figura 4.6-B).

Una vez que obtuvimos el patrón de expresión de los genes de las ω -3 desaturasas y la acumulación de ácidos grasos trienoicos durante el estudio del desarrollo de la hoja, decidimos analizar los mismos parámetros en cultivos líquidos de células fotosintéticas de soja [*Glycine max* (cv. Corsoy)]. En estos cultivos celulares fotosintéticos las células crecen en suspensión en un medio de cultivo líquido, duplicándose de manera indiferenciada. El comportamiento de estas células se asemeja al de las células jóvenes del mesófilo de hojas (Rogers y col., 1987). Estos cultivos celulares fotosintéticos utilizados para el estudio de la síntesis de lípidos y su reemplazo presentan niveles de fosfolípidos y galactolípidos similares a los de las hojas jóvenes (MacCarthy y Stumpf, 1980 ; Martin y col., 1984). En la figura 4.7 se muestran varias imágenes de cultivos líquidos de células fotosintéticas de soja.

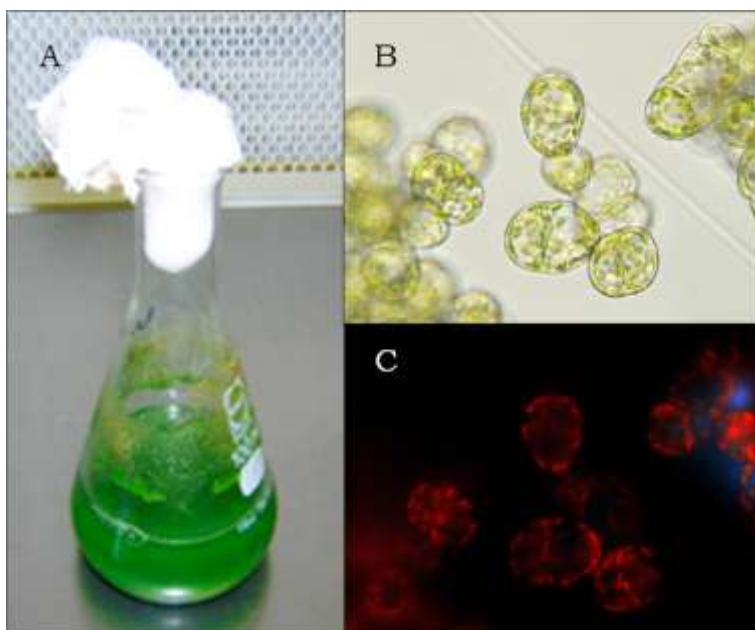


Figura 4.7 Imágenes de cultivos líquidos de células fotosintéticas de soja. (A) Cultivo líquido de células fotosintéticas de soja. (B) Imagen de microscopio de las células en cultivo líquido. (C) Imagen de microscopio óptico de la fluorescencia de la clorofila de estas células.

4.1.4. Composición de ácidos grasos totales en cultivos celulares fotosintéticos de soja

Como primer paso en el estudio de los cultivos celulares fotosintéticos de soja analizamos la composición de ácidos grasos extraídos de lípidos totales en cultivos de soja en crecimiento. La figura 4.8 muestra la composición de ácidos grasos de los cultivos celulares fotosintéticos de soja en diferentes etapas del crecimiento del mismo.

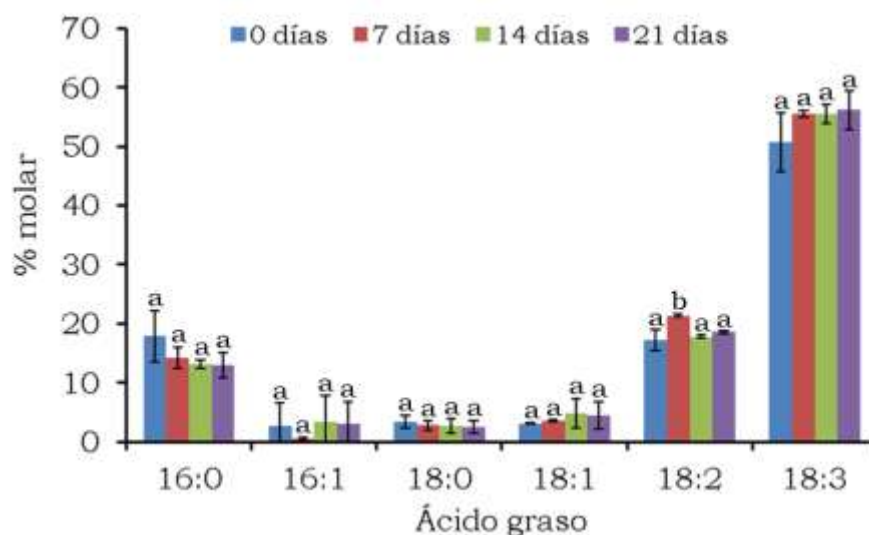


Figura 4.8 Composición de ácidos grasos de lípidos totales durante el crecimiento de los cultivos celulares fotosintéticos de soja. Las barras azul oscuro indican los ácidos grasos de los cultivos recién diluidos (0 días). Las rojas se corresponden con los cultivos de 7 días, las verdes con los de 14 días y las moradas con los de 21 días. Para cada ácido graso, letras diferentes indican diferencias significativas entre los puntos ($P < 0.05$).

Como se observa en la figura 4.8 y al igual que ocurre en hojas, los ácidos grasos mayoritarios en estos cultivos eran los poliinsaturados, y de ellos, el 18:3 era la especie más abundante. El nivel de 18:2 presentaba un crecimiento significativo a los 7 días de cultivo, que retornaba a los niveles iniciales en los siguientes estadios. Sin embargo, el resto de ácidos grasos incluyendo el 18:3, no presentaron cambios significativos durante el crecimiento de los cultivos celulares fotosintéticos. Este perfil global de ácidos grasos era similar al descrito anteriormente para estos cultivos (Martin y col., 1984 ; Collados y col., 2006) y se asemeja al de las hojas jóvenes recién abiertas (RA) o de 3 días (figura 4.3).

4.1.5. Expresión de las ω -3 desaturasas en cultivos celulares fotosintéticos de soja

A continuación, analizamos la expresión de los genes de las ω -3 desaturasas de soja durante el crecimiento de los cultivos celulares fotosintéticos de soja. Los resultados se muestran en la figura 4.9.

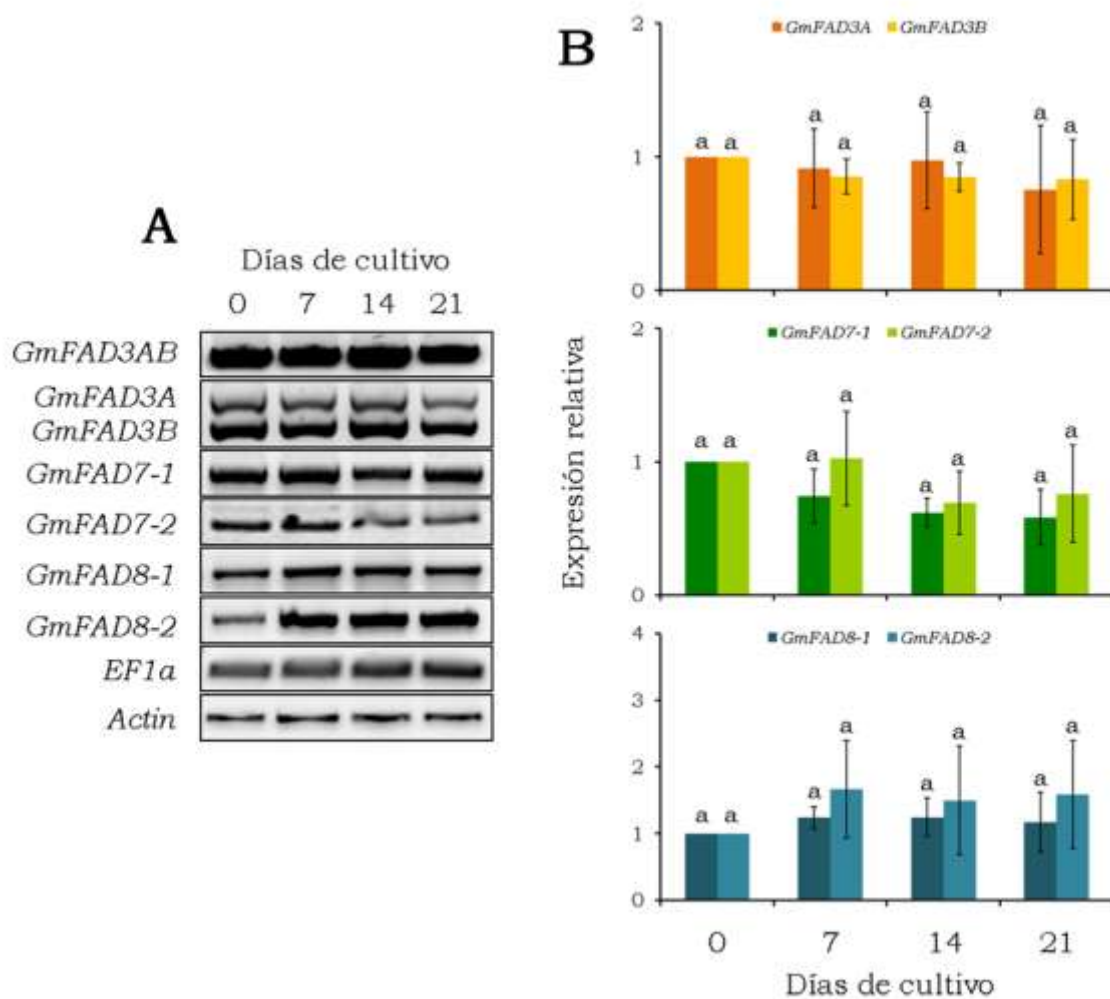


Figura 4.9 Expresión de los genes que codifican para las ω -3 desaturasas de soja en cultivos celulares recién diluidos (0 días) de 7 días, 14 días y 21 días. Los genes de la actina y EF1 α se utilizaron como genes de referencia. (A) RT-PCR semicuantitativa de uno de los experimentos de desarrollo cultivos celulares fotosintéticos de soja. (B) Representación de la media y desviación estándar de la expresión relativa de las bandas de PCR obtenidas en las

diferentes réplicas biológicas. Para cada gen, letras diferentes indican diferencias significativas entre puntos de muestra ($P < 0.05$).

Como se observa en la figura 4.9, todos los genes de las ω -3 desaturasas de soja se expresaban en los diferentes estadios de crecimiento del cultivo celular. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en hojas, no se observaron cambios significativos en los niveles de transcrito de ninguno de los genes de las ω -3 desaturasas durante el crecimiento del cultivo celular fotosintético. En el caso de las desaturasas reticulares, el análisis por digestión de los productos de PCR con *Van91I* que permite diferenciar *GmFAD3A* de *GmFAD3B*, mostraba que el nivel de transcrito de *GmFAD3B* era mayor que el del transcrito *GmFAD3A* en todos los estadios de crecimiento del cultivo celular (figura 4.9), lo cual sugiere una mayor participación de esta isoforma en estos cultivos celulares.

Tras obtener los resultados tanto en hojas trifoliales como en cultivos celulares fotosintéticos de soja, ambos productores de altos niveles de 18:3, decidimos analizar los mismos parámetros en un tejido que no produjera este ácido graso en altas proporciones. Para ello utilizamos las semillas de soja [*Glycine max* (cv. Volania)] durante la germinación. A excepción del lino (*Linum usitatissimum*) que contiene altos niveles de 18:3 en semillas (Vrinten y col., 2005), las semillas de otras plantas analizadas hasta el momento sólo contienen alrededor de un 20 % de este ácido graso, siendo el mayoritario el ácido linoleico (18:2) (Heppard y col., 1996 ; Andreu y col., 2010). En la figura 4.10 se muestran varias imágenes de la germinación de las semillas de soja.



Figura 4.10 Imágenes del desarrollo de las semillas de soja durante la germinación. (A) Semillas secas. (B) 3 días de germinación. (C) 6 días de germinación. (D) 9 días de germinación. (E) 12 días de germinación.

4.1.6. Expresión de las ω -3 desaturasas en semillas en germinación

Los resultados de expresión de los genes que codifican para las ω -3 desaturasas de soja durante la germinación de las semillas de soja, se muestran en la figura 4.11.

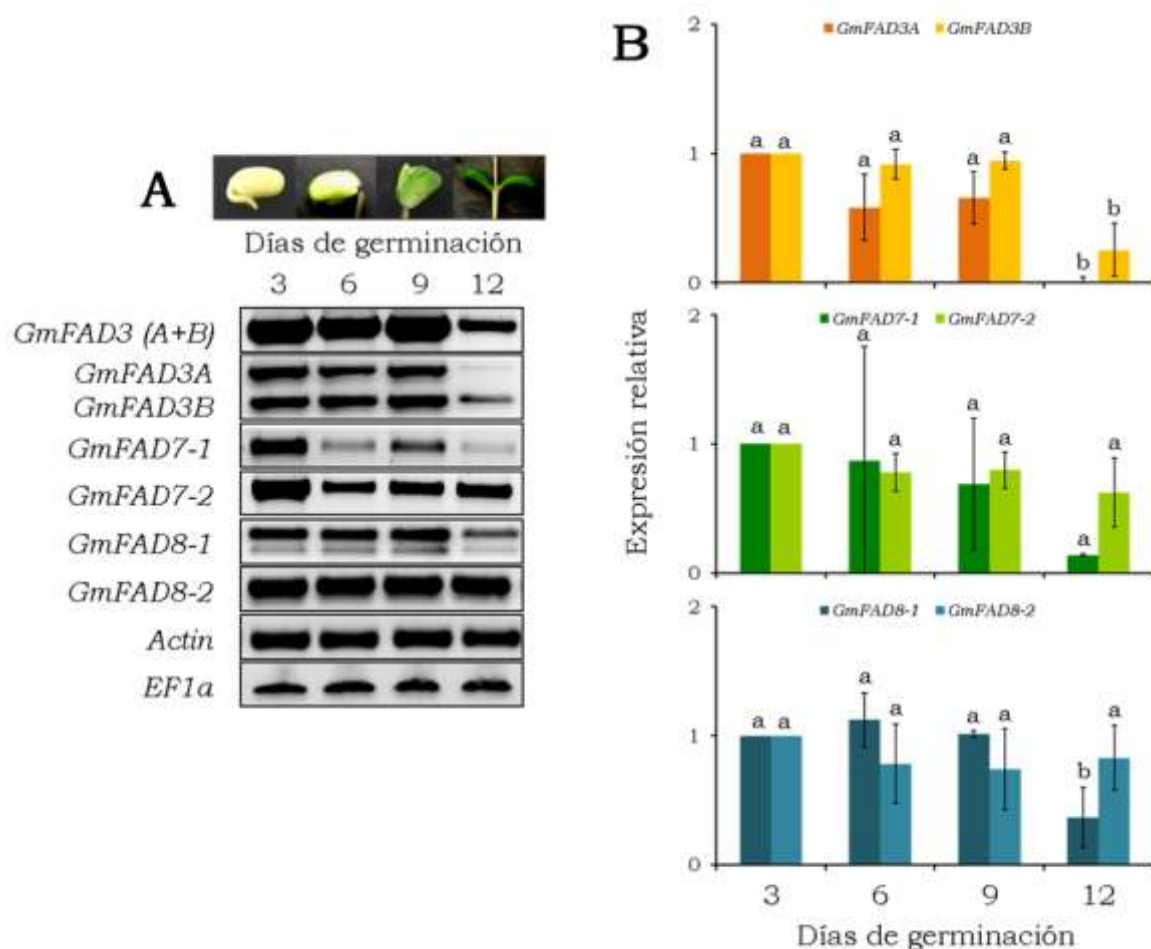


Figura 4.11 Expresión de los genes que codifican para las ω -3 desaturasas en semillas con 3 días en germinación, con 6 días, con 9 días y con 12 días. Los genes de la actina y EF1 α se utilizaron como genes de referencia. (A) RT-PCR semicuantitativa de uno de los experimentos de germinación de semillas. (B) Representación de la media y desviación estándar de la expresión relativa de las bandas de PCR obtenidas en los dos experimentos. Para cada gen, letras diferentes indican diferencias significativas entre los puntos ($P < 0.05$).

Como se observa en la figura 4.11, todos los genes de las ω -3 desaturasas de soja se expresaban durante la germinación de las semillas, al igual que en el resto de tejidos analizados. Algunos de estos genes también se expresaban en semillas secas, aunque sus niveles eran mucho menores o incluso nulos. Con objeto de

llevar a cabo la cuantificación y normalización de los datos de expresión, se eliminaron del análisis los datos de semillas secas, tomándose como referencia el punto de 3 días.

Es interesante señalar que el nivel de RNA mensajero de las ω -3 desaturasas reticulares (*GmFAD3A* y *GmFAD3B*) decrecía a los 12 días de germinación, coincidiendo con el desarrollo de tejido foliar. Los niveles de transcrito de las ω -3 desaturasas plastidiales (*GmFAD7-1* y *GmFAD7-2*) no presentaban variaciones significativas durante los diferentes estadios de germinación de las semillas, a pesar incluso de que el nivel de transcrito *GmFAD7-1* mostraba una alta variabilidad en las diferentes repeticiones biológicas (figura 4.10). De un modo similar, el transcrito de la ω -3 desaturasa plastidial *GmFAD8-2* no presentaba variaciones significativas durante la germinación de las semillas. Por el contrario, el nivel de mRNA de *GmFAD8-1* disminuía significativamente a los 12 días de germinación (figura 4.10).

La acumulación de transcritos de las ω -3 desaturasas de soja en semillas en germinación no provocaba la aparición de altos niveles de 18:3, pues éstos se mantenían en torno al 20 % durante todos los estadios de la germinación (datos no mostrados), lo que sugiere que toda la actividad ω -3 desaturasa en las semillas está fuertemente controlada. Esta observación ya ha sido descrita para diferentes especies (Lemieux y col., 1990 ; Heppard y col., 1996 ; Andreu y col., 2010).

4.1.7. Análisis *in silico* de los promotores de las ω -3 desaturasas de soja

Con el objetivo de identificar posibles elementos reguladores relacionados con el patrón de desarrollo que presentan algunas de las ω -3 desaturasas en hojas de soja, se realizó un análisis *in silico* de las regiones promotoras de los genes que las codifican. Este estudio se realizó con dos plataformas de análisis disponibles en la

red, PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) y PLANTCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). Para este estudio se analizaron de 1500 a 2000 pb en dirección 5' con respecto al ATG para cada gen, dependiendo de los requerimientos de cada software. Las secuencias analizadas se obtuvieron directamente de las secuencias genómicas de las ω -3 desaturasas en la base de datos de anotación del genoma de soja (<http://www.phytozome.net/> v8.0).

Los dos programas mostraban elementos reguladores comunes para todas las ω -3 desaturasas, como los relacionados con la regulación por la luz, el ritmo circadiano o las hormonas vegetales. La tabla 4.1 muestra los diferentes elementos reguladores y su frecuencia de aparición en las secuencias promotoras de los genes de las ω -3 desaturasas en soja.

	ω -3 desaturasas de soja					
	<i>GmFAD3A</i>	<i>GmFAD3B</i>	<i>GmFAD7-1</i>	<i>GmFAD7-2</i>	<i>GmFAD8-1</i>	<i>GmFAD8-2</i>
Luz	21	19	7	12	15	21
Anaerobiosis	2	1				
Calor	2	3		2	2	3
Sequía			1		1	1
Frío						1
Herida						1
Ritmo circadiano	4	2	1	1		1
Plántula	1		1	1		
Raíz	1					
Meristemo					1	1
Hongos			1	1	1	1
Defensa y estrés	4			2	1	1
Metil Jasmonato	4	4				4
Ácido salicílico		2		2	4	4
Giberelinas	1	1	2	1	3	2
Ácido abscísico	1	1			1	
Auxinas					1	
Etileno						1
HD-Zip	3	1				

Tabla 4.1 Elementos reguladores que se encuentran en los promotores de las ω -3 desaturasas en el estudio in silico según el software PLANTCARE

(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>). Los números en la tabla indican la cantidad de elementos reguladores de cada tipo que se identifican para cada gen.

Como se puede observar en la tabla 4.1, se encuentran algunos elementos reguladores relacionados con la anaerobiosis o la expresión en raíces para las desaturasas *GmFAD3A* y *GmFAD3B*. Estas predicciones serían consistentes con datos experimentales publicados con anterioridad en los que se relaciona la mayor

actividad de FAD3 en tejidos anaeróbicos o raíces (Lemieux y col., 1990 ; Andreu y col., 2010). Del mismo modo, se encontraron una serie de elementos en el caso de las ω -3 desaturasas plastidiales relacionados con la sequía, el frío o la herida (tabla 4.1).

No obstante, uno de los resultados más significativos obtenidos en este estudio, fue la identificación de elementos reguladores de tipo HD-Zip en las regiones promotoras de los genes *GmFAD3A* y *GmFAD3B*. La familia de factores de transcripción tipo HD-Zip se caracteriza por la presencia en su estructura proteica de un homeodominio (o motivo de unión a DNA) próximo a un motivo de “dedos de cinc”. Este tipo de factores de transcripción sólo se han identificado en plantas, pero están relacionados con otras proteínas tipo HD en eucariotas. En plantas, los factores de transcripción tipo HD-Zip se han relacionado con las respuestas de adaptación al medio durante el crecimiento (Harris y col., 2011). Estas respuestas pueden ocurrir en relación a diversos factores como el desarrollo de la hoja, la formación de los pelos radicales o el efecto sombra (Aoyama y col., 1995 ; Steindler y col., 1999). En *Arabidopsis* se han identificado hasta 47 genes de la familia HD-Zip, y se han clasificado en grupos del 1 al 4 según criterios de similitud de secuencia o de distribución de intrones y exones. La familia HD-Zip en *Arabidopsis* incluye tanto activadores como represores de la transcripción (Aoyama y col., 1995 ; Steindler y col., 1999). En soja, se ha identificado *GmHZ1*, un homólogo de la clase 1 de factores de transcripción HD-Zip de *Arabidopsis*. En un trabajo reciente, se ha observado que *GmHZ1* es un activador de la respuesta de soja a la infección por SMV (Wang y col., 2005). Sin embargo, se desconoce si *GmHZ1* podría desarrollar otro tipo de funciones como la diferenciación o el desarrollo de tejido.

La figura 4.12 muestra un alineamiento de las regiones promotoras de los genes *GmFAD3A* y *GmFAD3B* y la localización de las secuencias de reconocimiento para los factores de transcripción tipo HD-Zip.



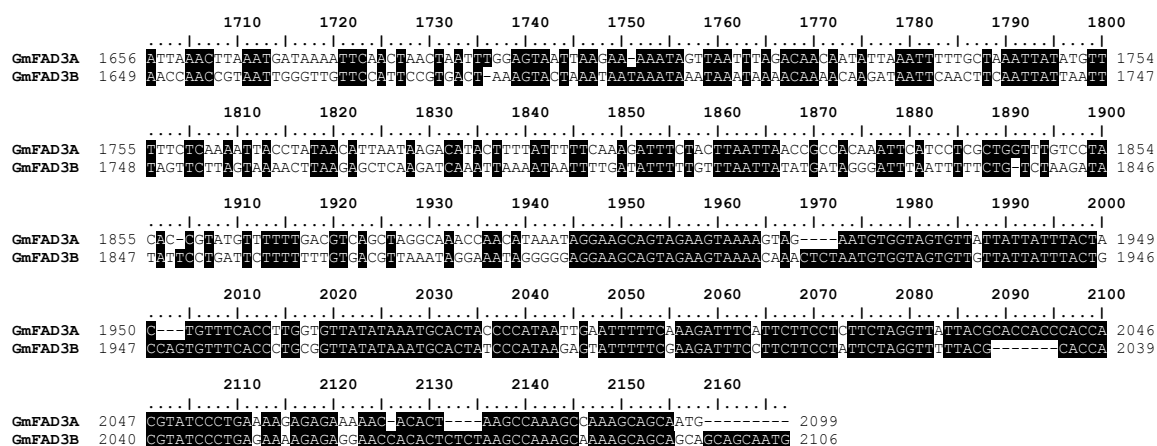


Figura 4.12 Alineamiento de las regiones promotoras de los genes *GmFAD3A* y *GmFAD3B* de soja. Con fondo rojo se indican las secuencias de unión para HD-Zip en *GmFAD3A*. Con fondo verde se indica la secuencia de unión para HD-Zip en *GmFAD3B*. Para el alineamiento se utilizaron 2000 pb en dirección 5' del ATG.

Como se puede observar en la figura 4.12, en el análisis *in silico* se encontró 3 veces la secuencia consenso de reconocimiento para los factores de transcripción HD-Zip de clase 1 en la región promotora de *GmFAD3A* (CAAT(A/T)ATTG, en las posiciones -1476, -579 y -529 delante del ATG). Este mismo tipo de secuencia consenso se encontró solamente una vez en el caso de la región promotora de *GmFAD3B* (en la posición -1403 delante del ATG). Estas secuencias de reconocimiento no se detectaron en ninguna de las regiones promotoras de los genes *GmFAD7-1*, *GmFAD7-2*, *GmFAD8-1* y *GmFAD8-2*, sugiriendo un posible papel de regulación específico de las ω -3 desaturasas reticulares.

4.1.8. Análisis de los datos de expresión de las ω -3 desaturasas disponibles en otras especies (*Arabidopsis* y Trigo)

Uno de los objetivos posteriores del trabajo fue también el de comparar los datos obtenidos en nuestro trabajo con los presentes en la literatura o en determinadas bases de datos en relación a otras especies vegetales. Para esta parte, se realizó un análisis comparado con los datos obtenidos durante este trabajo y los disponibles en la base de datos eFP Browser (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>) sobre *Arabidopsis* (Schmid y col., 2005), y los presentes en la literatura sobre trigo (Horiguchi y col., 1998). El análisis comparativo de las tres especies permite evaluar los mecanismos de regulación que participan en la síntesis de ácidos grasos trienoicos durante el desarrollo de la hoja. Estas tres especies vegetales, permiten el análisis relativo de una planta 18:3 dicotiledónea (soja), una planta 16:3 dicotiledónea (*Arabidopsis*) y una planta 18:3 monocotiledónea (trigo). Los datos correspondientes a las dos especies adicionales se presentan a continuación en sendas figuras para facilitar la discusión del capítulo. Los datos de *Arabidopsis* se corresponden con los experimentos de desarrollo hechos con el chip ATH1. Los códigos TAIR de los genes de las ω -3 desaturasas de *Arabidopsis* son: *AtFAD3* (At2g29980), *AtFAD7* (At3g11170) y *AtFAD8* (At5g05580). Los datos de expresión se muestran en la figura 4.13.

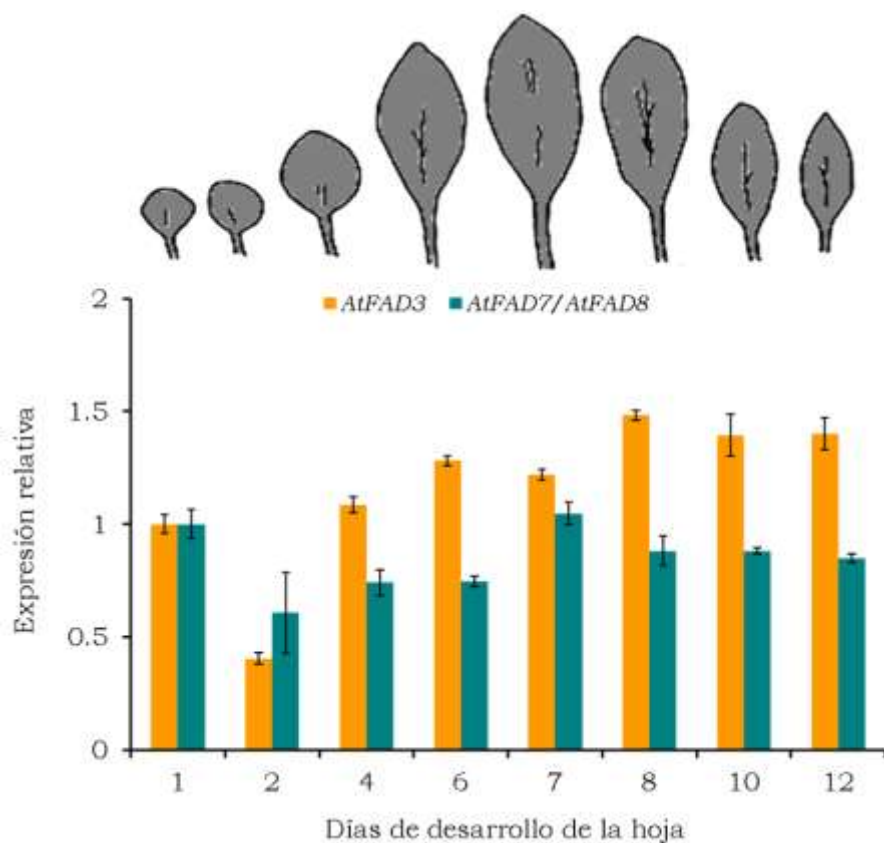


Figura 4.13 Expresión de los genes de las ω -3 desaturasas de Arabidopsis durante el desarrollo de la hoja. Expresión relativa extraída de los experimentos de microarrays depositados en la base de datos eFP Browser.

Es importante resaltar que el chip ATH1 utilizado para los análisis representados en la figura 4.13, no permite la diferenciación entre los transcritos *AtFAD7* y *AtFAD8*, lo cual impide la comparación de manera individual, de estos datos con los obtenidos durante este trabajo en soja. Los datos representados en la figura 4.13 muestran que todas las ω -3 desaturasas de Arabidopsis, *AtFAD3* y *AtFAD7+AtFAD8* se expresan en todos los estadios de desarrollo de la hoja, además de que su expresión no presentó ninguna variación con el desarrollo de este tejido. Cabe destacar sin embargo, que los valores absolutos de expresión de los genes de las ω -3 desaturasas plastidiales eran mayores que los de la ω -3 desaturasa reticular.

En el caso de los datos de trigo presentes en la literatura, éstos se extrajeron del trabajo de Horiguchi y col., (1998). Adicionalmente se realizó una cuantificación relativa en base a la imagen del northern blot mostrado en ese artículo. La figura 4.14 muestra estos datos.

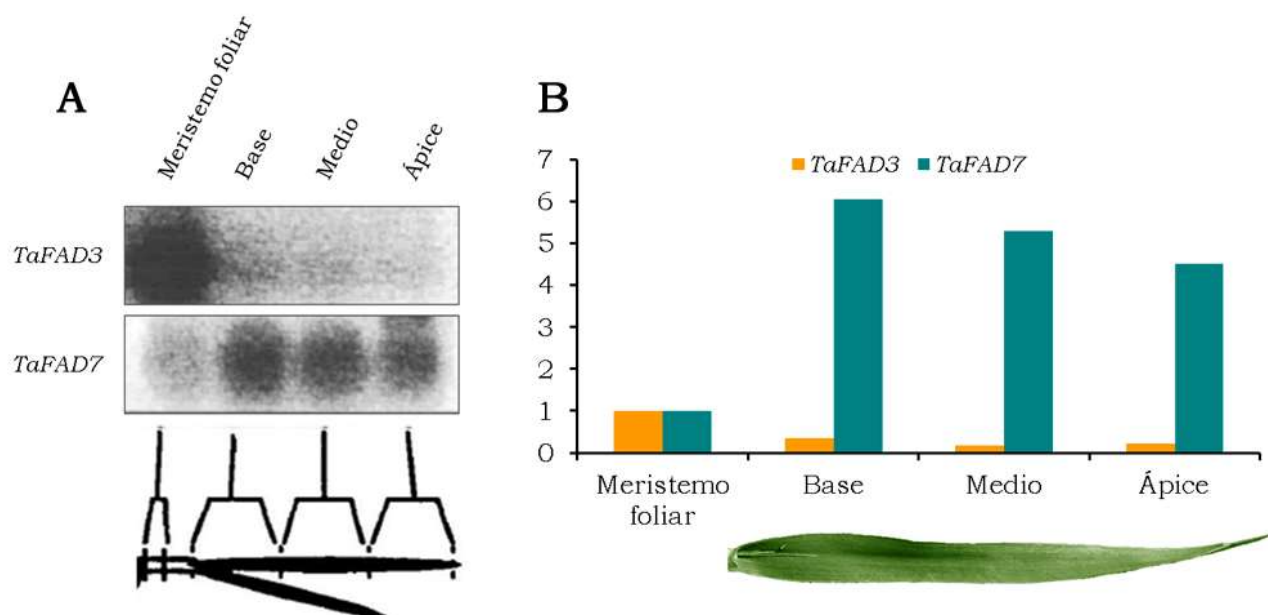


Figura 4.14 Expresión de los genes de dos ω -3 desaturasas de trigo durante el desarrollo de la hoja. (A) Imagen extraída y adaptada de Horiguchi y col., (1998). (B) Cuantificación relativa de los datos de (A) tomando como gen de referencia el mostrado en el artículo (tRNA-Gly).

Los datos publicados por Horiguchi y col., (1998) mostraban la ausencia de del mRNA *TaFAD3* en hojas de trigo en desarrollo, sin embargo éste sí se detectaba en tejidos de alta proliferación como los meristemos, y en tejidos no fotosintéticos como las raíces. A su vez, el mRNA *TaFAD7* se detectaba en niveles altos en hojas sin mostrar variaciones durante el desarrollo de las mismas (Horiguchi y col., 1998). En el trabajo de Horiguchi y col., (1998) no se mostraban datos sobre *TaFAD8*, citando que se ha ligado anteriormente el papel de esta desaturasa a la respuesta de las plantas al frío (Gibson y col., 1994).

4.1.9. Discusión

En la literatura existen numerosos estudios que describen la acumulación del ácido graso 18:3 durante el desarrollo del tejido foliar en plantas (Leech y col., 1973 ; Horiguchi y col., 1996a ; Horiguchi y col., 1996b ; Horiguchi y col., 1998). Sin embargo, los estudios que valoran de la contribución de las ω -3 desaturasas a la síntesis de 18:3 durante el desarrollo de las hojas a nivel molecular, son poco frecuentes y se centran principalmente en plantas monocotiledóneas (Horiguchi y col., 1996a ; Horiguchi y col., 1998), probablemente porque su patrón de desarrollo de tejido es más sencillo que el de dicotiledóneas (Tsukaya, 1995). El objetivo de este estudio llevado a cabo durante esta Tesis Doctoral era el de analizar la contribución a nivel molecular de las ω -3 desaturasas reticulares y plastidiales, a la producción de ácidos graso linolénico (18:3) durante el desarrollo en soja.

La primera conclusión que se extrae del análisis comparativo de las tres especies es que en las dos plantas dicotiledóneas (soja y *Arabidopsis*) se detectaba la expresión de los genes *FAD3* y *FAD7+FAD8* en hojas, sugiriendo la participación de ambos tipos de enzimas en la biosíntesis de 18:3 en plantas dicotiledóneas. Es importante remarcar además, que en soja se detectaron tanto los dos genes *GmFAD7* como los dos *GmFAD8* en todos los estadios de desarrollo de la hoja. Sin embargo en trigo (planta monocotiledónea), actúa un mecanismo espacial de regulación de la expresión de ambos genes separando la expresión de *TaFAD3* en tejidos no fotosintéticos y la de *TaFAD7* en hojas (Horiguchi y col., 1998). La hipótesis de que este patrón de expresión se pudiera relacionar con el distinto modelo de desarrollo de las hojas en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, requeriría un análisis exhaustivo en otras especies vegetales. No obstante, los patrones de expresión de las ω -3 desaturasas en trigo sugieren que el ácido graso 18:3 presente en lípidos cloroplásticos y extracloroplásticos en las hojas de esta

planta se debe a la actividad de las ω -3 desaturasas plastidiales. En el caso de la raíz, o los meristemos (tejidos con alta proliferación celular) sería la actividad reticular TaFAD3 la responsable de la producción de 18:3 en estas especies.

La expresión de ambos tipos de ω -3 desaturasas (reticulares y plastidiales) en las dos especies dicotiledóneas comparadas es un hecho en común entre ambas, sin embargo, presentan diferencias entre sí. En el caso de soja se encontró un patrón temporal de regulación tanto en los genes *GmFAD3* como en ambos genes *GmFAD8*. En el caso de las ω -3 desaturasas reticulares, el nivel de mRNA de *GmFAD3A* y *GmFAD3B* decreció con el desarrollo de la hoja, sugiriendo que su participación podría ser más relevante en hojas jóvenes. La expresión de estos genes en cultivos celulares fotosintéticos de soja no varía, lo cual sería consistente con la similitud descrita entre estos tejidos y las hojas jóvenes (Martin y col., 1984).

El patrón transcripcional observado para los genes *GmFAD3* durante el desarrollo de la hoja en soja, sugiere la existencia de una regulación específica coordinada con la formación de tejido foliar y la maduración del mismo. El hallazgo de elementos reguladores de tipo HD-Zip en las secuencias promotoras de los genes de las ω -3 desaturasas reticulares (*GmFAD3*), que no se encontraron entre las secuencias promotoras de las ω -3 desaturasas plastidiales, sugiere que estos elementos reguladores podrían formar parte del mecanismo de regulación por desarrollo que actúa de manera específica sobre las desaturasas reticulares *GmFAD3*. Es importante mencionar, que no se encontraron elementos reguladores tipo HD-Zip cuando se analizaron las secuencias promotoras de los genes de las ω -3 desaturasas de *Arabidopsis*, sugiriendo que el papel de estos factores de transcripción en el desarrollo de la hoja, si existiera, no sería generalizado.

Es interesante el hecho de que a pesar de la disminución de los niveles de mRNA *GmFAD3* durante el desarrollo de la hoja, los niveles de 18:3 siguieron

incrementando (figura 4.3). Basándonos únicamente en los datos de expresión, se podría concluir que la producción de 18:3 en las etapas más posteriores del desarrollo de la hoja en soja corresponde a la actividad de las ω -3 desaturasas plastidiales. Los datos de expresión presentados en este trabajo muestran que los niveles de mRNA *GmFAD8-2* aumentan con el desarrollo de la hoja, sin mostrar cambios significativos los niveles de mRNA *GmFAD7*. El aumento de mRNA *GmFAD8-2* sugiere que esta isoforma podría jugar un papel específico durante el desarrollo de la hoja, incluso a temperatura ambiente. Sin embargo, en ausencia de datos bioquímicos o funcionales de estas enzimas, es muy difícil asignar la contribución individual de cada desaturasa a la producción de 18:3 durante el desarrollo de la hoja. Por ejemplo, a pesar de que los niveles de mRNA de *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* no varían durante el desarrollo de la hoja, no se puede descartar que exista alguna modificación de tipo post-transcripcional que regule su actividad. Este tipo de mecanismos ya se han propuesto para algunas ω -3 desaturasas, como el aumento de la estabilidad del mRNA de *GmFAD7* en oscuridad (Collados y col., 2006) o la disminución de la estabilidad de la proteína *AtFAD8* tras la exposición a altas temperaturas (Matsuda y col., 2005).

Los perfiles de acumulación de ácidos grasos y de expresión de las ω -3 desaturasas en soja durante el desarrollo de la hoja sugieren que en esta especie, la contribución de ambos orgánulos (retículo y cloroplasto) a la desaturación de ácidos grasos sufre un cambio a lo largo del desarrollo de la hoja. En hojas jóvenes ambos orgánulos estarían contribuyendo a la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados, mientras que en hojas maduras la mayoría del 18:3 producido resultaría de la actividad de las enzimas plastidiales. Aunque el chip ATH1 no permite la diferenciación entre *AtFAD7* y *AtFAD8*, no parece que existan cambios significativos importantes en la expresión de ambos genes durante el desarrollo de la hoja en *Arabidopsis*. Este resultado no es extraño, dado que *Arabidopsis* es una planta 16:3

y que en estas plantas el plastidio es un orgánulo más importante para la síntesis de glicerolípidos que en las plantas 18:3, debido a la actividad de la ruta procariota (Browse y col., 1986b). De hecho, los valores absolutos de expresión de los genes de las ω -3 desaturasas plastidiales (*AtFAD7*+*AtFAD8*) eran mayores que los de la ω -3 desaturasa reticular *AtFAD3* en todos los estadios de desarrollo de la hoja. En relación a esto, el análisis del mutante *fad7* de *Arabidopsis* durante el desarrollo de la hoja mostraba que, en el mutante se veían reducidos los niveles de ácidos grasos trienoicos durante este proceso, demostrando así el papel esencial de *AtFAD7* en la producción de ácidos grasos trienoicos durante el desarrollo de la hoja (Horiguchi y col., 1996b).

La composición en ácidos grasos de las hojas es diferente a la encontrada en semillas, ya que estas últimas se caracterizan por tener bajos niveles de ácido graso 18:3 (Lemieux y col., 1990 ; Heppard y col., 1996). Los datos presentados en el trabajo realizado durante esta Tesis Doctoral demuestran que los mRNA de todas las ω -3 desaturasas, tanto reticulares como plastidiales, se acumulan en todos los estadios de germinación de la semilla de soja. La presencia de estos niveles de mRNA en este tejido es concomitante con unos niveles bajos de ácido graso 18:3 (alrededor de un 20 %), siendo estos niveles los habituales en otras especies (Lemieux y col., 1990). Los datos obtenidos con el mutante *fad3* de *Arabidopsis* sugieren que la actividad ω -3 desaturasa reticular es la principal responsable de la acumulación de 18:3 en semillas (Lemieux y col., 1990). Esta relación no se ha establecido para las semillas de soja, ya que el número de copias de genes *GmFAD3* en esta especie es elevado, lo cual dificulta la obtención de mutantes. De todos modos, incluso si la actividad ω -3 desaturasa reticular es la principal responsable de la acumulación de este ácido graso en semillas de soja, dado el alto nivel de expresión en este tejido de los genes *GmFAD7* y *GmFAD8*, sería necesaria una regulación de estas actividades enzimáticas. Los resultados obtenidos sugieren la

existencia de un mecanismo de regulación post-transcripcional que controla de manera exhaustiva la actividad ω -3 desaturasa en semillas de soja en germinación.

4.2. LOCALIZACIÓN, ORGANIZACIÓN Y REGULACIÓN DE LAS ω -6 y ω -3 DESATURASAS PLASTIDIALES

La gran mayoría de las proteínas que participan en las rutas de biosíntesis de ácidos grasos son proteínas de membrana. Su elevado carácter hidrofóbico dificulta los estudios de localización subcelular, purificación y caracterización bioquímica de estas enzimas. Excepto en el caso de la desaturasa soluble (FAB2), no se dispone de información estructural para el resto de desaturasas. Los modelos topológicos propuestos hasta el momento para estas enzimas derivan del propuesto para la desaturasa *OLE1* de levaduras (Stukey y col., 1990). Todas estas características dificultan también el diseño de anticuerpos específicos que permitirían estudiar la distribución de la proteína en los diferentes tejidos de la planta y su abundancia relativa en diferentes condiciones de crecimiento, desarrollo de tejidos o en condiciones de estrés.

Sin embargo, y a pesar de estos problemas, algunas de estas proteínas se han localizado gracias a la detección de su actividad en fracciones celulares concretas, a los experimentos de inserción en membrana, a la sobreexpresión en sistemas heterólogos tanto con epítomos concocidos como con genes reporteros y en último lugar a los experimentos de proteómica de proteínas de membrana. La localización de las enzimas responsables de la síntesis de ácidos grasos supone un avance en la comprensión del funcionamiento de estas rutas de síntesis. La información sobre cada una de las enzimas que participan en las rutas de síntesis de ácidos grasos en *Arabidopsis* se encuentra recopilada en la página web ARALIP (*Arabidopsis* Acyl Lipid Metabolism) <http://arabidopsisacyllipids.plantbiology.msu.edu/enzymes>. (Beisson y col., 2003). Como ejemplo, en el caso de las enzimas plastidiales responsables de la síntesis de glicerolípidos, la primera enzima responsable de la incorporación de los ácidos grasos a los lípidos es la glicerol-3-fosfato

aciltransferasa (GPAT) aunque normalmente se designa como ACT1 o ATS1. Esta proteína se localizó en el estroma cloroplástico (Joyard y Douce, 1977 ; Nishida y col., 1987). La actividad de la monoacilglicerol-3-fosfato aciltransferasa (LPAAT) se detectó en la envuelta interna del cloroplasto (Joyard y Douce, 1977). Las dos membranas que envuelven del cloroplasto (envueltas externa e interna) son el principal entorno donde se han localizado las proteínas relacionadas con la síntesis de los diversos tipos de lípidos cloroplásticos y la posterior desaturación de los ácidos grasos que los componen (Douce, 1974). Como ejemplos de localización en estas membranas, la actividad MGDG sintasa se localizó en la envuelta interna del cloroplasto (Block y col., 1983b), la proteína MGD1 se localizó en esa misma envuelta mediante el uso de anticuerpos (Miege y col., 1999) y finalmente los tres miembros de la familia (MGD1, MGD2 y MGD3), se caracterizaron y localizaron mediante fluorescencia con genes reporteros (Awai y col., 2001). Por otro lado, la enzima DGD1 se localizó en la envuelta externa del cloroplasto mediante la detección de su actividad (Cline y Keegstra, 1983). Estudios posteriores de inserción en la membrana confirmaron su localización (Froehlich y col., 2001a).

Uno de los principales objetivos de esta Tesis Doctoral fue el de abordar el problema de la localización y organización subcelular de las w-6 y w-3 desaturasas plastidiales como un primer paso para comprender el funcionamiento de estas enzimas, más allá de los datos de expresión o perfiles de ácidos grasos de los que disponemos hasta el momento. La información sobre la localización de las desaturasas de membrana está ampliamente descrita en numerosos trabajos en la literatura, un resumen de los datos disponibles para estas enzimas se muestra en la tabla 4.1.

Desaturasas de Arabidopsis	FAD2	FAD3	FAD4	FAD5	FAD6	FAD7	FAD8
Hipótesis de función y localización (mutantes)	(Lemieux y col., 1990)	(Lemieux y col., 1990; Browse y col., 1993)	(Browse y col., 1985)	(Kunst y col., 1989)	(Browse y col., 1989)	(Browse y col., 1986)	(McConn y col., 1994)
Ensayos enzimáticos directos sobre membranas purificadas	(Slack y col., 1976; Stymne y Appleqvist, 1980; Browse y Slack, 1981; Miquel y Browse, 1992)	(Stymne y Appleqvist, 1980; Browse y Slack, 1981; Stymne y col., 1992)			(Schmidt y Heinz, 1990; Schmidt y Heinz, 1993)		
Identificación del gen y complementación del mutante (función en plantas)	(Okuley y col., 1994)	(Arondel y col., 1992)	(Gao y col., 2009)	(Hellmann y col., 2004a; Hellmann y col., 2004b)	(Falcone y col., 1994)	(Iba y col., 1993)	(Gibson y col., 1994)
Sobreexpresión en sistemas heterólogos	Reticulo endoplásmico (N. tabacum BY-2 cells) (Dyer J.M. y Mullen R.T., 2001)	Reticulo endoplásmico (N. tabacum BY-2 cells) (Dyer J.M. y Mullen R.T., 2001)					
MS/MS	Membrana plasmática (Mitra y col., 2009)			Envuelta interna cloroplástica (Ferro y col., 2010). Sin validación.	Plastidio (Zybailov y col., 2008). Envuelta interna cloroplástica (Ferro y col., 2002; Froehlich y col., 2003; Ferro y col., 2003)	Plastidio (Zybailov y col., 2008). Envuelta interna cloroplástica (Ferro y col., 2002; Froehlich y col., 2003; Ferro y col., 2003)	Plastidio (Froehlich y col., 2003)

Tabla 4.1 Resumen de los trabajos de identificación de la función y localización de las desaturasas de ácidos grasos de plantas. Los datos fueron extraídos de la literatura indicada en cada caso y de las bases de datos AT_CHLORO (http://www.grenoble.prabi.fr/at_chloro/) y SUBA3 (<http://suba.plantenergy.uwa.edu.au/>). Con fondo marrón se destacan las desaturasas localizadas en el retículo endoplásmico y con fondo verde las localizadas en el cloroplasto. Con fuente amarilla se resaltan las localizaciones llevadas a cabo mediante estudios de proteómica.

Como se indica en la tabla 4.1, las desaturasas FAD2 y FAD3 de *Arabidopsis* se han localizado en el retículo endoplásmico mediante la detección directa de su actividad (Slack y col., 1976 ; Stymne y Appelqvist, 1978 ; Miquel y Browse, 1992). Las desaturasas de membrana FAD2 y FAD3, también se han localizado en el retículo endoplásmico mediante sobreexpresión en suspensiones de células BY-2 de tabaco, utilizando fusiones en N-terminal con los epítomos “myc” (myelocytomatosis) o “HA” (human influenza hemagglutinin) y anticuerpos específicos para éstos (Dyer y Mullen, 2001). Aunque los datos de identificación por masas de Mitra y col., (2009) detectan FAD2 en la membrana plasmática, esta localización no es necesariamente extraña, ya que se han detectado zonas de contacto entre membranas de diferentes orgánulos como las que existen entre la envuelta externa del cloroplasto y el retículo endoplásmico, denominadas PLAMs (Plastid Associated Microsomes) (Andersson y col., 2007).

El caso de la desaturasa FAD4 (que produce trans-16:1) es algo más particular, pues aunque la hipótesis de su existencia está presente en la literatura desde el aislamiento del mutante *fad4* (McCourt y col., 1985), ésta ha sido la desaturasa que más tarde se ha identificado debido a sus diferencias con el resto de desaturasas que introducen los dobles enlaces en posición cis. El aislamiento del gen que la codifica se realizó en el año 2009, y se localizó en el cloroplasto mediante expresión transitoria (Gao y col., 2009). Sin embargo no existen datos de proteómica que confirmen su localización.

En el caso de la $\Delta 9$ desaturasa FAD5, la identificación del gen que la codifica también tardó en realizarse, debido a su similitud con otras desaturasas extraplastidiales (Heilmann y col., 2004a ; Heilmann y col., 2004b). Los estudios de proteómica localizan esta desaturasa en la envuelta interna cloroplástica. No obstante, la base de datos AT_CHLORO (http://www.grenoble.prabi.fr/at_chloro/) indica que su identificación aún está por confirmar.

En el caso particular de la ω -6 desaturasa FAD6, su actividad se detectó en envueltas del cloroplasto mediante ensayos enzimáticos directos (Schmidt y Heinz, 1990a), llegando más adelante incluso a purificar la enzima partiendo de envueltas del cloroplasto de *Spinacia oleacea* (espinaca) que permitieron un análisis posterior de actividad (Schmidt y Heinz, 1993). Además la localización de esta enzima en la envuelta del cloroplasto fue comprobada gracias a los estudios de proteómica del cloroplasto (Ferro y col., 2003 ; Froehlich y col., 2003 ; Ferro y col., 2010). Estos estudios de proteómica permitieron localizar también las ω -3 desaturasas plastidiales, FAD7 y FAD8, en la envuelta cloroplástica. Sin embargo, no existen datos sobre la organización de estas enzimas en la membrana. Estos datos podrían aportar información necesaria para la comprensión de su funcionamiento.

4.2.1. Fraccionamientos subcelulares de soja: cloroplastos y envueltas del cloroplasto

Una primera aproximación para estudiar la localización de las ω -3 desaturasas de soja es estudiar su distribución en diferentes fracciones subcelulares, en nuestro caso principalmente cloroplastos y fracciones subcloroplásticas. Los protocolos de aislamiento de cloroplastos y otras fracciones subcloroplásticas utilizados en esta Tesis Doctoral se describen en el apartado de materiales y métodos.

El aislamiento de cloroplastos intactos se realizaba partiendo de aproximadamente 100 g de hojas de soja, que eran troceadas, lavadas, homogeneizadas con tampón y filtradas. El filtrado se sedimentaba por centrifugación y se resuspendía en un volumen menor, sometiendo posteriormente a la separación de sus componentes mediante la centrifugación en un gradiente de percoll. Del gradiente se aislaba la banda correspondiente a los cloroplastos. La figura 4.1 muestra una imagen de microscopía óptica representativa de la fracción de cloroplastos obtenidos mediante este aislamiento.

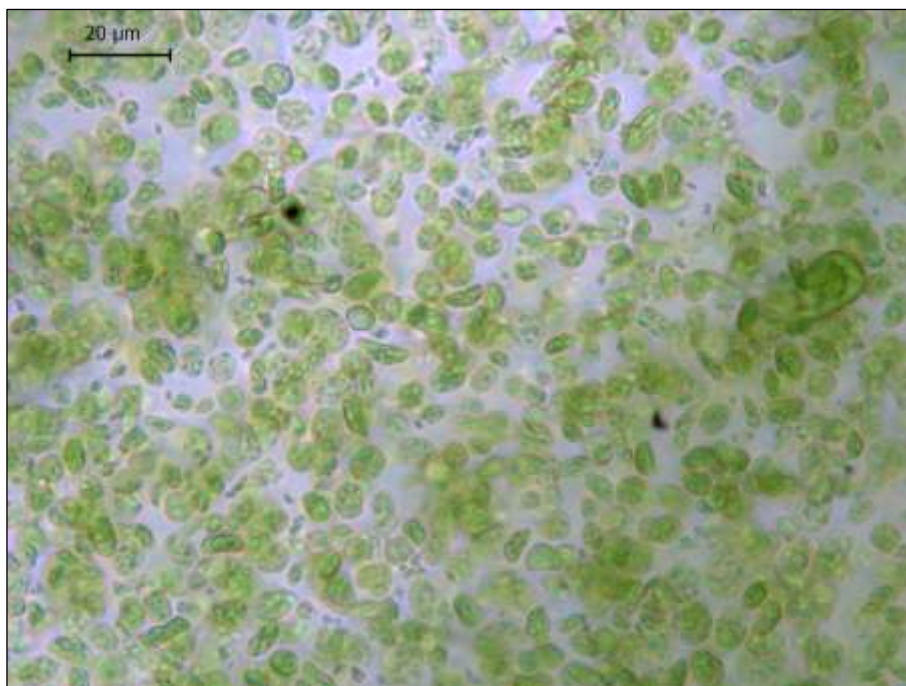


Figura 4.1 Imagen de microscopía óptica de la fracción de cloroplastos aislada por el método utilizado en esta Tesis Doctoral. Los cloroplastos intactos presentan una forma elíptica y condensada, los rotos presentan una forma más redondeada.

Como se observa en la figura 4.1, las muestras de cloroplastos eran homogéneas y contenían principalmente cloroplastos tanto rotos como intactos. En ocasiones, estas muestras de cloroplastos contenían células del parénquima empalizada que no se habían roto durante el proceso y que migraban junto a los cloroplastos en el gradiente de percoll.

El aislamiento de envueltas del cloroplasto se realizaba partiendo de 250 g de hojas de soja, que eran también lavadas, troceadas, homogeneizadas con tampón y filtradas. El filtrado, enriquecido en cloroplastos, se sedimentaba por centrifugación y se lavaba, resuspendiéndolo posteriormente en un tampón con sacarosa. El homogeneizado se sometía a tres ciclos de congelación y descongelación a -20°C , para proceder a la ruptura de las envueltas cloroplásticas y se dejaba reposar a 4°C durante una hora para facilitar la separación de las envueltas y los tilacoides. Más

tarde se procedía a la sedimentación de la fracción tilacoidal y la purificación de las envueltas en un gradiente de sacarosa. La banda amarillenta obtenida en el gradiente era lavada con tampón, congelada en nitrógeno líquido y conservada a -80 C. El grado de purificación de este fraccionamiento se observa por la coloración de la banda tal y como se observa en la figura 4.2. Las envueltas del cloroplasto carecen de clorofila (verde), que es un pigmento tilacoidal, y sus principales pigmentos son los carotenoides, de entre ellos el mayoritario es la violaxantina de color anaranjado (Douce y Joyard, 1981).

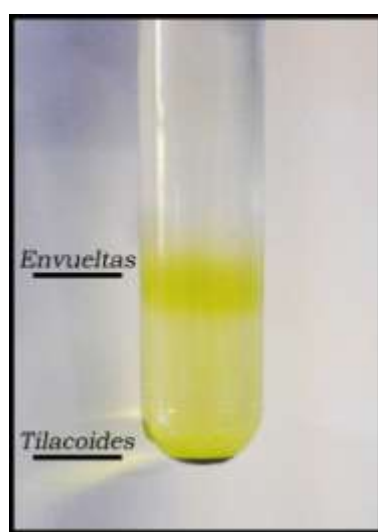
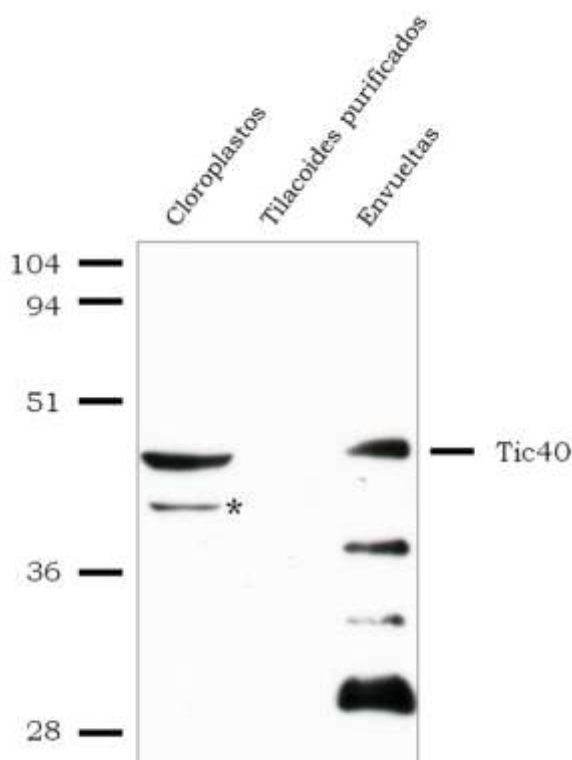


Figura 4.2 Imagen del aspecto del gradiente de sacarosa tras la ultracentrifugación. La banda superior (amarilla) corresponde a las envueltas y el sedimento situado en la parte inferior del tubo (verde) son los tilacoides.

4.2.2. Valoración de los fraccionamientos con el anticuerpo antiTic40

La valoración de las fracciones subcelulares de soja obtenidas por los diversos protocolos detallados se realizó con el anticuerpo antiTic40 (Agrisera) como se puede observar en la figura 4.3. Tic40 es una proteína que participa en el sistema

de importe de proteínas al cloroplasto. Además se utiliza como marcador de envuelta interna cloroplástica. Este anticuerpo comercial se obtuvo para la proteína de *Arabidopsis* y no había sido testeado hasta el momento en soja.



*Figura 4.3 Detección mediante western blot de la proteína Tic40 en las diferentes fracciones subcelulares obtenidas de plantas de soja. El anticuerpo primario utilizado fue el antiTic40 de Agrisera (AS10 709). * Banda inespecífica de cloroplastos.*

El peso molecular de la proteína Tic40 se estima que es de unos 45-48 kDa en *Arabidopsis*. En consecuencia, la banda de la proteína Tic40 en la figura 4.3 podría corresponder a la de mayor intensidad en cloroplastos, que también se observa en la muestra de envueltas. El resto de bandas observadas en el carril correspondiente a las envueltas podrían ser productos de degradación de Tic40. La banda inferior de cloroplastos podría corresponderse con una banda inespecífica propia del anticuerpo secundario que se explicará en un apartado posterior. El resultado más

relevante de este experimento fue que el anticuerpo antiTic40 no detectó ninguna banda en las muestras de tilacoides purificados, lo que sugiere que el fraccionamiento utilizado es correcto.

4.2.3. Detección de GmFAD7 en fracciones subcelulares y tejidos de soja

Una vez que los protocolos de obtención de fracciones subcelulares de soja estuvieron puestos a punto, se procedió a evaluar la presencia de la proteína FAD7 en cada una de ellas, además de en otros tejidos. Uno de los objetivos principales de esta Tesis Doctoral, era el de caracterizar los perfiles de proteína asociados a la utilización del anticuerpo antiGmFAD7 obtenido en nuestro grupo de investigación. Para llevar a cabo este objetivo, se realizó un trabajo exhaustivo de identificación de bandas en geles monodimensionales. Esto permitiría relacionar estos perfiles con los que obtuviéramos posteriormente en geles bidimensionales, donde realizaríamos la identificación de las proteínas por masas. Las bandas observadas con este anticuerpo en los diferentes tejidos y fracciones subcelulares estudiados en esta Tesis Doctoral se muestran en la figura 4.4.

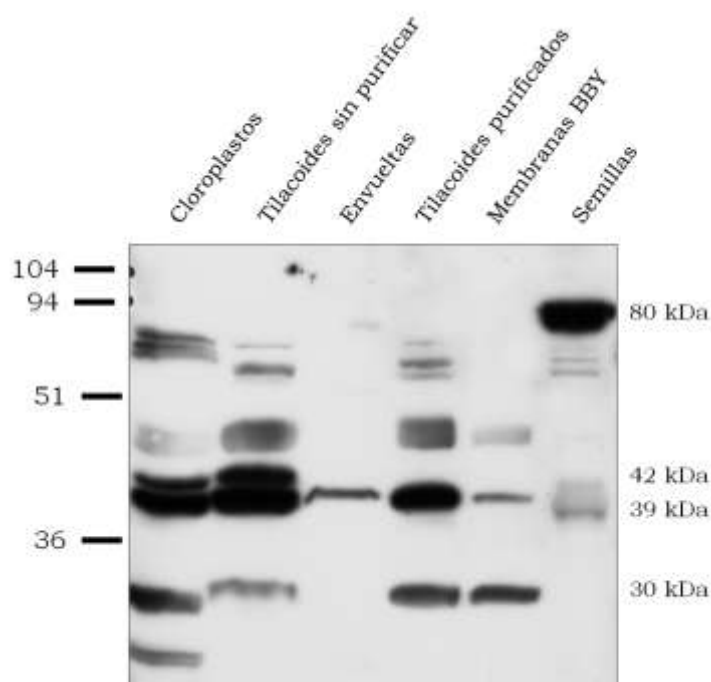


Figura 4.4 Bandas observadas mediante western blot sobre los diferentes tejidos y fracciones subcelulares obtenidos con el anticuerpo antiGmFAD7 (dilución 1:200). El anticuerpo secundario utilizado fue el goat anti-rabbit de Agrisera (dilución 1:25000). Para la realización de este western blot se cargaron 15 µg de proteína de cada fracción.

Los perfiles de bandas obtenidos durante esta Tesis Doctoral eran similares a los obtenidos en los trabajos anteriores del grupo. Como se observa en la figura 4.4, existen dos tipos de bandas detectadas con este anticuerpo, que se diferencian por la intensidad de su señal. Las bandas más intensas fueron las de 39 y 42 kDa en cloroplastos y tilacoides sin purificar; la de 80 kDa observada en semillas y la de 30 kDa detectada en cloroplastos, tilacoides (purificados o no) y membranas BBY. El resto de bandas observadas, menos intensas, variaban de intensidad dependiendo del estado de los reactivos de revelado y en ocasiones ni siquiera aparecían, así que se consideraron bandas inespecíficas o ruido de fondo.

4.2.4. Revelado con el suero preimmune

Para descartar la presencia de bandas inespecíficas y detectar estas en los revelados de geles bidimensionales llevamos a cabo varios controles; el primero de ellos consistió en el revelado de las mismas muestras con el suero preimmune. El suero preimmune es el suero extraído del conejo antes de realizar el proceso de inmunización que da lugar a la síntesis del anticuerpo. Los resultados se observan en la figura 4.5.

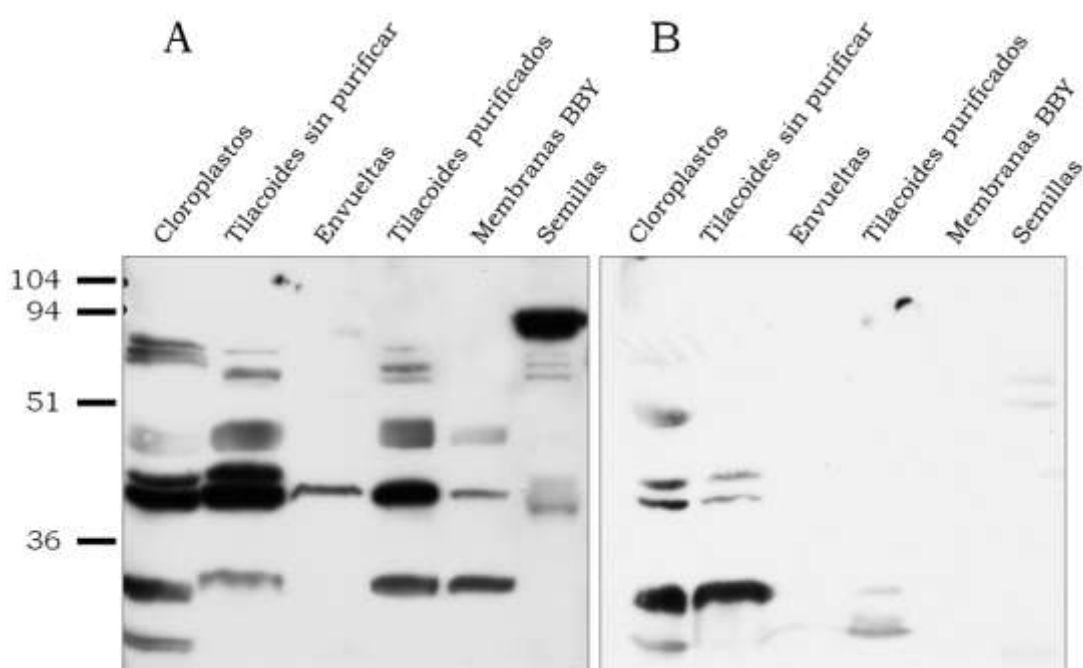


Figura 4.5 Control realizado con el suero preimmune para la identificación de bandas específicas. (A) Bandas detectadas con el anticuerpo antiGmFAD7 (dilución 1:200). (B) Bandas detectadas con el suero preimmune (dilución 1:200). El anticuerpo secundario utilizado en ambos casos fue el goat anti-rabbit de Agrisera (dilución 1:25000). Para la realización de este western blot se cargaron 15 μ g de proteína de cada fracción.

Como se observa en la figura 4.5-B, los anticuerpos propios del suero preimmune detectaban proteínas en las muestras analizadas. La intensidad de

algunas de estas bandas era menor que la de las bandas detectadas por el anticuerpo antiGmFAD7. Como se observa en la figura 4.5-B, el suero preinmune reconocía las dos bandas de 42 y 39 kDa en cloroplastos y tilacoides sin purificar, así como las de 30 kDa observadas en estas mismas muestras. Además, el suero preinmune reconocía diversas bandas inespecíficas de menor intensidad en varias muestras. Por otro lado, el suero preinmune no reconocía la banda de aproximadamente 80 kDa detectada en semillas.

4.2.5. Revelados con anticuerpos secundarios

En segundo lugar, se llevó a cabo un control revelando exclusivamente con el anticuerpo secundario. El objetivo de este control era el de descartar que éste estuviera reaccionando por sí mismo con alguna proteína de la muestra y por lo tanto, revelando bandas inespecíficas. Los resultados se muestran en la figura 4.6.

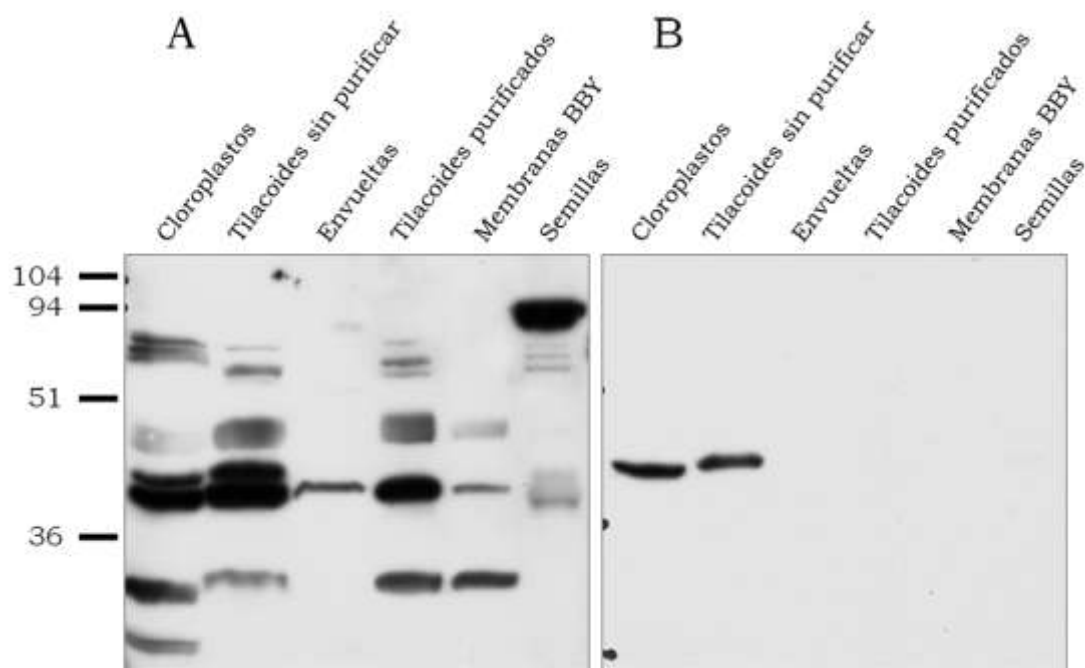


Figura 4.6 Control realizado con el anticuerpo secundario para la identificación de bandas específicas. (A) Bandas detectadas con el anticuerpo antiGmFAD7 (dilución 1:200). (B) Bandas detectadas exclusivamente con el anticuerpo secundario. El anticuerpo secundario utilizado en ambos casos fue el goat anti-rabbit de Agrisera (dilución 1:25000). Para la realización de este western blot se cargaron 15 μ g de proteína de cada fracción.

Como se observa en la figura 4.6-B, el anticuerpo secundario por sí mismo, detectaba proteínas en las muestras analizadas. La banda detectada por el anticuerpo secundario en muestras de cloroplastos y tilacoides sin purificar era la banda de 42 kDa que se detectaba en muestras de cloroplastos y tilacoides sin purificar.

Tras esta observación, se planteó un cambio de anticuerpo secundario. El utilizado hasta el momento por nuestro laboratorio había sido desarrollado en cabra (Goat anti-rabbit), y la casa comercial que comercializa habitualmente este anticuerpo secundario, (Agrisera) nos ofreció otro desarrollado en burro (Donkey

anti-rabbit). Para testearlos, se utilizaron muestras de cloroplastos de soja y *Vigna unguiculata* (cowpea) (que mostraban habitualmente la banda de 42 kDa) y se revelaron con ambos tipos de anticuerpos secundarios. Los resultados se muestran en la figura 4.7.

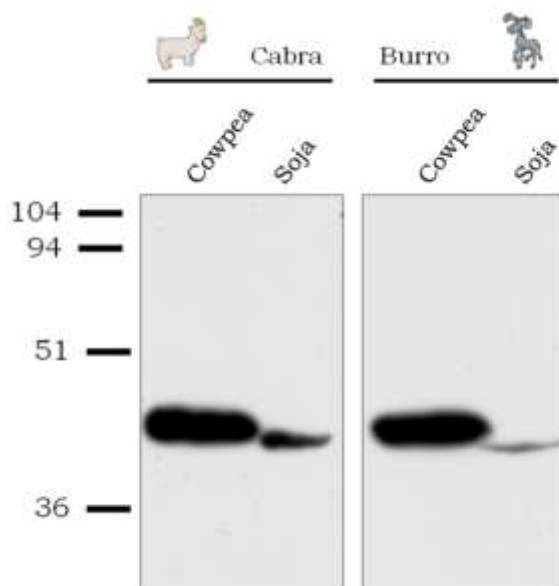


Figura 4.7 Bandas detectadas exclusivamente con los anticuerpos secundarios de cabra (izquierda) y burro (derecha) en muestras de cloroplastos de cowpea y soja. Los dos anticuerpos secundarios se utilizaron en dilución 1:25000. Para la realización de este western blot se cargaron 15 μ g de proteína de cada fracción.

Como se observa en la figura 4.7, ambos tipos de anticuerpos secundarios reconocían la misma banda en ambas especies vegetales.

4.2.6. Revelados con el anticuerpo inmunodeplecionado

En último lugar, se realizaron controles de inmunodepleción del anticuerpo. En estos controles, el anticuerpo se bloqueó en sus sitios específicos con el péptido sintético utilizado para su producción en relaciones 15:1 y 100:1 (péptido: anticuerpo). Las muestras se revelaron del mismo modo que otras veces con el

objeto de detectar qué bandas de las que aparecen son bandas inespecíficas. Las bandas que sí se detectan con el anticuerpo y no se detectan con el anticuerpo inmunodeplecionado, podrían considerarse específicas. Se utilizaron dos tipos de inmunodepleción en los experimentos realizados durante esta Tesis Doctoral, tal y como se indican en el apartado de materiales y métodos. Fundamentalmente, éstos difieren en el volumen total de incubación del anticuerpo con el péptido. En la inmunodepleción tipo I, el volumen es pequeño (150 μ l) y el movimiento de las moléculas en el líquido es menor, pero la probabilidad de interacción entre moléculas de anticuerpo y péptido es mayor debido a la proximidad. En la inmunodepleción tipo II, el volumen es mayor (5 ml), y aunque los choques entre moléculas de anticuerpo y péptido son menos probables, el mayor movimiento del líquido favorece el movimiento de las moléculas y aumenta la probabilidad de este tipo de encuentros. Los resultados obtenidos mediante la inmunodepleción tipo I y II se muestran en las figuras 4.8 y 4.9, respectivamente. En el caso de la inmunodepleción tipo II (figura 4.9), se probaron también diferentes proporciones de péptido respecto a la misma cantidad de anticuerpo, 15:1 y 100:1 (péptido: anticuerpo).

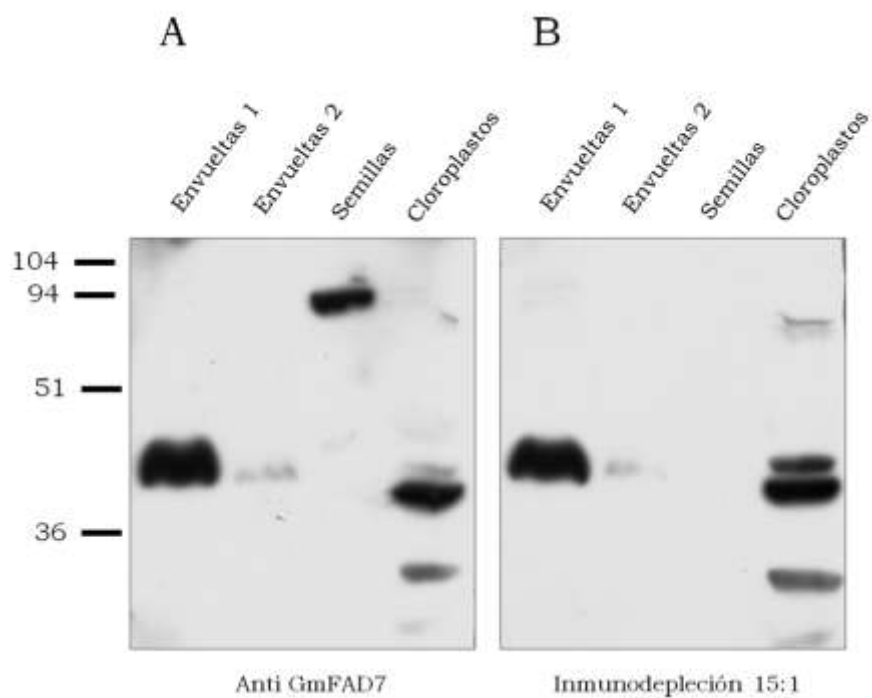


Figura 4.8 Control realizado con el anticuerpo inmunodeplecionado para la identificación de bandas inespecíficas. (A) Bandas detectadas con el anticuerpo antiGmFAD7 (dilución 1:200). (B) Bandas detectadas con el anticuerpo antiGmFAD7 (dilución 1:200) bloqueado con el péptido en relación 15:1 (Inmunodepleción tipo I). Para la realización de este western blot se cargaron 15 μ g de proteína de cada fracción.

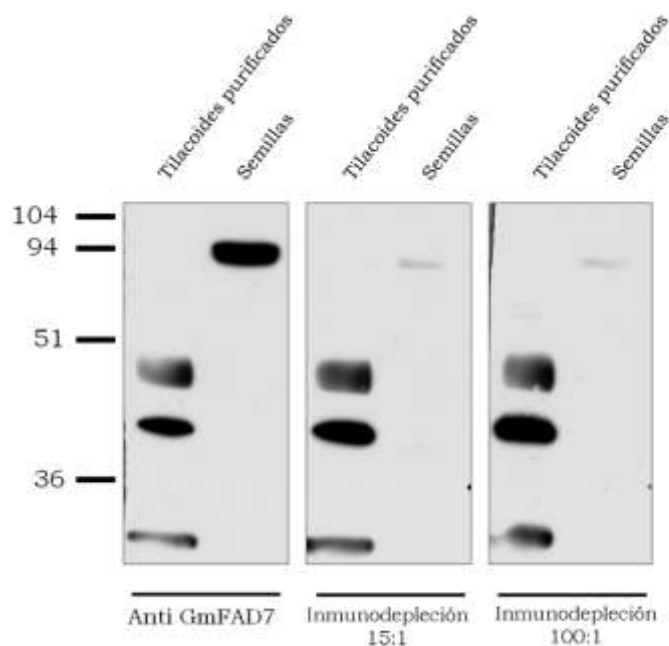


Figura 4.9 Control realizado con el anticuerpo inmunodeplecionado para la identificación de bandas inespecíficas. Bandas detectadas con el anticuerpo antiGmFAD7 (izquierda, dilución 1:200). Bandas detectadas con el anticuerpo antiGmFAD7 (dilución 1:200) bloqueado con el péptido en relación 1:15 (Inmunodepleción tipo II) (medio). Bandas detectadas con el anticuerpo antiGmFAD7 (dilución 1:200) bloqueado con el péptido en relación 1:100 (Inmunodepleción tipo II) (derecha). Para la realización de este western blot se cargaron 15 μ g de proteína de cada fracción.

Como se observa en las figuras 4.8 y 4.9, ambos tipos de inmunodeplección dieron el mismo tipo de resultado, con el anticuerpo bloqueado en sus sitios específicos se detectaban las mismas bandas que con el anticuerpo sin inmunodeplecionar, exceptuando la banda de 80 kDa de semillas. Ésta pareció ser la única banda específica.

Debido a las dudas sobre la especificidad del anticuerpo que se plantearon tras la realización de los respectivos controles, se decidió intentar analizar mediante nano-HPLC masas las proteínas que se localizaban en el área de detección de las

bandas de western blot. Para ello se tomaron muestras de un gel teñido con coomassie coloidal a la altura correspondiente de las bandas detectadas por quimioluminiscencia. Para el cálculo de la altura adecuada a la que tomar las muestras en los geles, se hizo un estudio del factor de retención (Rf) de las bandas en todos los análisis realizados con anterioridad. La toma de muestra realizada se puede observar en la figura 4.10.

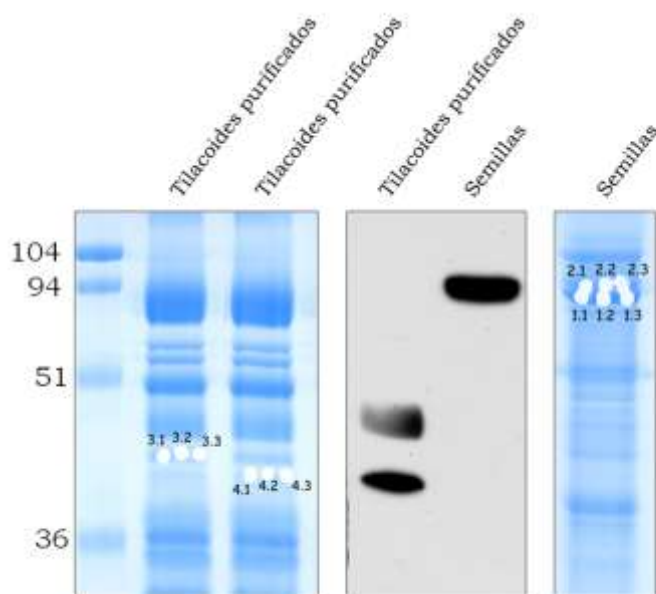


Figura 4.10 Imagen de los geles utilizados para el análisis de las proteínas contenidas en las bandas detectadas por el anticuerpo antiGmFAD7 y las muestras tomadas para el análisis por nano-HPLC masas.

Como se observa en la figura 4.10, se tomaron dos muestras (haciendo tres repeticiones técnicas de cada una de ellas) de cada banda detectada por la tinción de coomassie coloidal en las áreas de detección de las bandas del anticuerpo. En todas las bandas en las que se tomó muestra se detectaron mezclas de proteínas. A pesar de ello, en ninguna de ellas se detectó FAD7, aunque el análisis definitivo de los datos no ha sido completado.

Los estudios realizados con el anticuerpo antiGmFAD7 realizados durante esta Tesis Doctoral presentan datos que generan dudas razonables sobre el reconocimiento específico de la proteína en alguna de las muestras analizadas. La única banda que superó los controles realizados, y por lo tanto la única que se hubiera podido considerar específica bajo estos controles, fue la de 80 kDa de semillas. Sin embargo el análisis por masas no identificó la proteína FAD7 en esa zona del gel (como tampoco fue identificada en tilacoides). Adicionalmente a estos datos, la proteína FAD7 sería a priori, más abundante en muestras de cloroplastos o envueltas, que en semillas, ya que los datos de proteómica en Arabidopsis la localizan allí (Ferro y col., 2003). En semillas, la principal ω -3 desaturasa que se ha relacionado con la síntesis de ácidos grasos poliinsaturados es FAD3 (Lemieux y col., 1990). Todos estos datos desaconsejan el uso del anticuerpo para la localización de la proteína FAD7.

4.2.7. Clonación de los genes de las ω -3 desaturasas plastidiales (FAD7) de soja y Arabidopsis y la ω -6 desaturasa plastidial (FAD6) de Arabidopsis en vectores de destino para la transformación de plantas

A la vista de los problemas para utilizar anticuerpos específicos contra la proteína GmFAD7 y tras la identificación de un segundo gen FAD7 en soja en un trabajo anterior del grupo (Andreu y col., 2010), se decidió utilizar otra aproximación experimental para el estudio de su localización subcelular. Para ello, decidimos realizar la localización de las proteínas FAD7 mediante la fusión de sus secuencias codificantes con un gen reportero y la generación (por transformación con *Agrobacterium tumefaciens*) de líneas transgénicas estables. Debido a la facilidad de trabajo con la tecnología Gateway, decidimos ampliar el estudio también a las proteínas FAD6 y FAD7 de Arabidopsis.

Las construcciones realizadas en el vector de entrada pENTR™/D-TOPO se muestran en la figura 4.11.

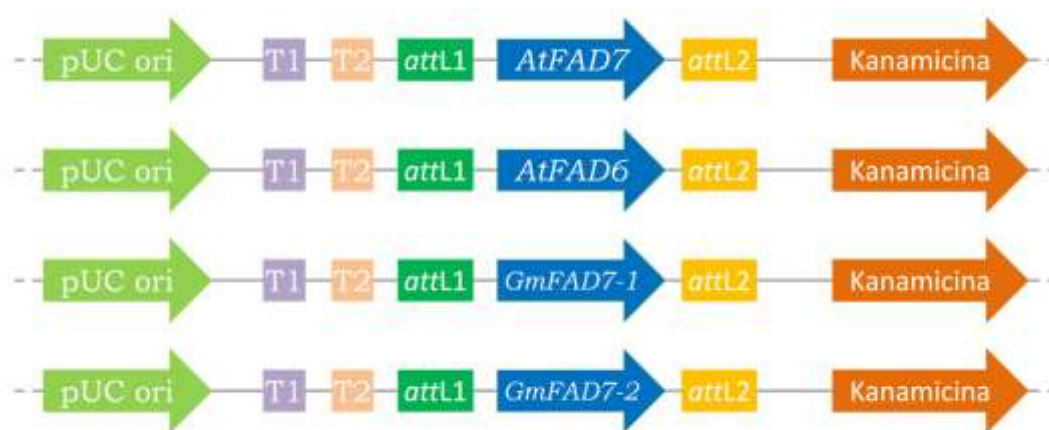


Figura 4.11 Esquema de los vectores de entrada pENTR™/D-TOPO generados mediante la inserción de los genes amplificados por PCR.

Como se muestra en la figura 4.11 se generaron cuatro vectores de entrada distintos mediante el clonaje de los genes *AtFAD6*, *AtFAD7*, *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2*. La amplificación de estos genes por PCR y su posterior clonación se describe en el apartado 5.2.5.1 de materiales y métodos.

Los cuatro insertos se trasladaron a los vectores de destino mediante la reacción LR clonasa descrita en el apartado 5.2.5.2 de materiales y métodos. Los vectores de destino generados mediante esta técnica se muestran en la figura 4.12.

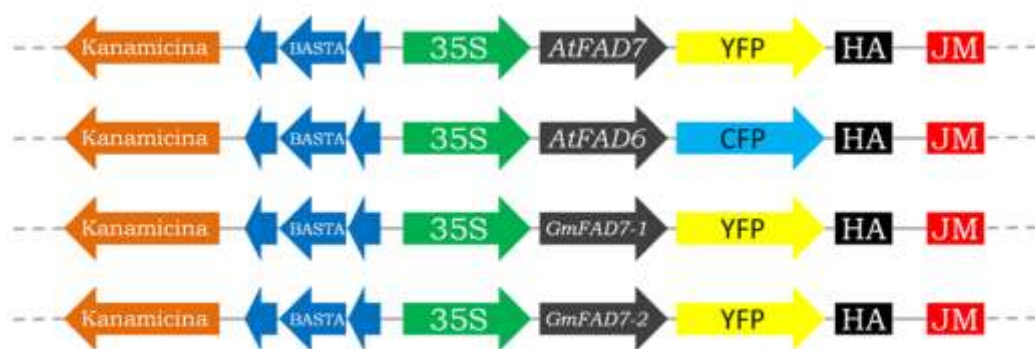


Figura 4.12 Esquema de los vectores de destino generados mediante las reacciones LR clonasa realizadas durante esta Tesis Doctoral.

Como se observa en la figura 4.12 se generaron cuatro vectores de destino para la transformación de Arabidopsis y la generación de líneas estables. Además de éstos, las plantas de Arabidopsis se transformaron con los vectores vacíos correspondientes, y fueron utilizadas como control negativo. El vector pEarleyGate101 contenía la proteína YFP (Yellow Fluorescent Protein) fusionada en C-terminal y el vector pEarleyGate102 contenía la CFP (Cian Fluorescent Protein) también en C-terminal. Ambos vectores pertenecen a la colección de vectores de destino compatible con Gateway descrita en Earley y col., (2006). Utilizamos ambos vectores con vistas a estudiar en un futuro la posible co-localización de las proteínas AtFAD6 (con CFP) y AtFAD7 (con YFP). Si los patrones de localización de ambas proteínas por separado fueran similares, sería posible utilizar la técnica de FRET para estudiar si existe interacción entre ellas. La elección de las fusiones en C-terminal y no en N-terminal se hizo pensando en que las proteínas de estudio son cloroplásticas y poseen un péptido señal cloroplástico que es procesado tras la inserción de la proteína en la membrana, por lo que de hacer las fusiones en N-terminal probablemente no hubiéramos obtenido ningún tipo de señal.

4.2.8. Generación de líneas estables homocigóticas de *Arabidopsis*

Tras la construcción de los vectores de destino, su inserción en *Agrobacterium tumefaciens* y la transformación de plantas de *Arabidopsis* de fenotipo silvestre, éstas se propagaron hasta obtener plantas homocigóticas para la inserción. Éstas se caracterizaban por presentar un porcentaje de germinación en medio selectivo con glufosinato de amonio, próximo al 100 %. Los porcentajes de germinación de las generaciones T2 y T3 de estas plantas en medio selectivo se muestran en la tabla 4.2.

Construcción	% germinación T2	% germinación T3
pEarleyGate101 Vector vacío	59	94
pEarleyGate102 Vector vacío	66	80
AtFAD6:CFP	58	95
AtFAD7:YFP	70	83
GmFAD7-1:YFP	47	72
GmFAD7-2:YFP	69	96

Tabla 4.2 Porcentajes de germinación de las semillas de las generaciones T2 y T3 de las líneas estables generadas durante esta Tesis Doctoral. Con fondo rojo se indican las que dieron resultados positivos y con fondo gris las que no dieron resultados.

Los porcentajes teóricos de germinación de las generaciones T2 y T3 deberían ser de un 75 % y un 100 % respectivamente, los valores de germinación de las

líneas generadas obtenidos experimentalmente, aunque diferentes, se aproximaban a éstos. Cabe resaltar también, que aunque algunas de las líneas homocigóticas no presentaban porcentajes de germinación próximos a los teóricamente aceptados, dieron resultados positivos.

4.2.9. Microscopía confocal de las líneas estables homocigóticas generadas

Las muestras de plantas se prepararon en fresco con glicerol como solución de montaje y se observaron directamente en el microscopio confocal Leica-SP2 (Servicio Científico Técnico de Microscopía e Imagen del IACS-Aragón).

En la figura 4.13 se observan las muestras de las líneas estables que contenían los vectores vacíos pEarleyGate101 y pEarleyGate102 utilizadas como control negativo.

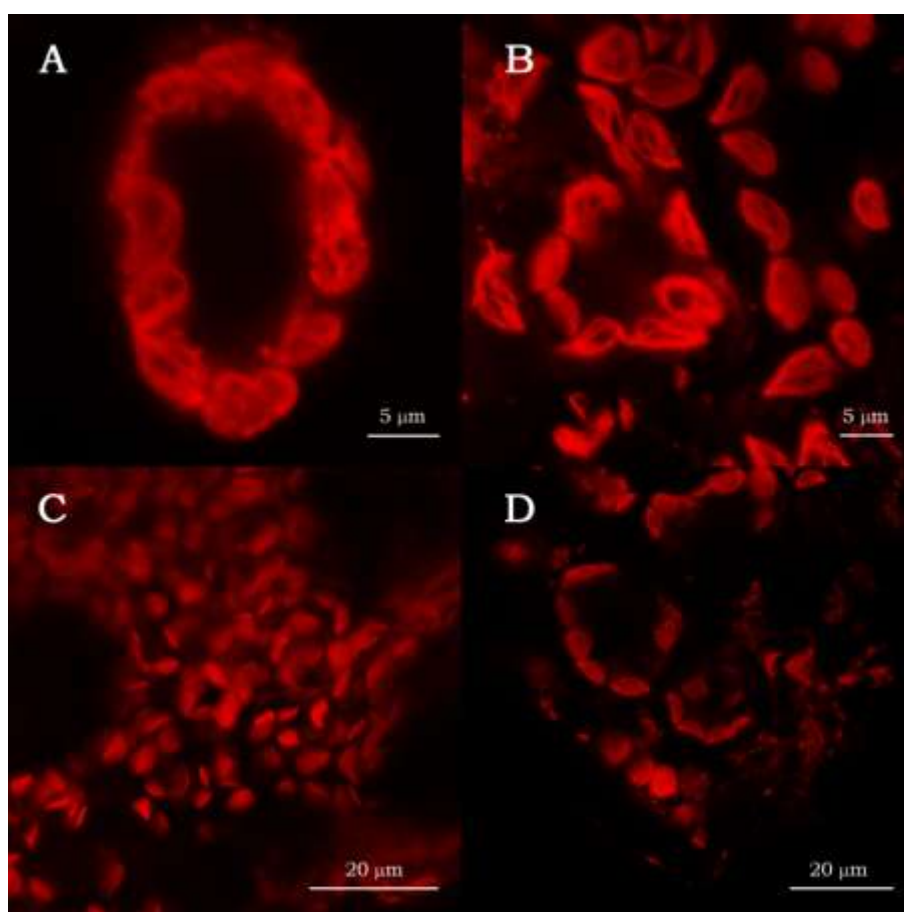


Figura 4.13 Imágenes de microscopía confocal donde se observan la ausencia de señal de fluorescencia (YFP o CFP) en las plantas transformadas con los vectores vacíos. En estas muestras solamente se observa la señal emitida por la clorofila de los cloroplastos (en rojo). (A) y (B) Imágenes de plantas transformadas con el vector pEarleyGate101 (con YFP) vacío ($\lambda_{\text{excitación YFP}}$: 514 nm, $\lambda_{\text{emisión YFP}}$: 518-580 nm). (C) y (D) Imágenes de plantas transformadas con el vector pEarleyGate102 (con CFP) vacío ($\lambda_{\text{excitación CFP}}$: 458 nm, $\lambda_{\text{emisión CFP}}$: 465-571). En todos los casos se registró la fluorescencia de la clorofila para la colocación en los cloroplastos ($\lambda_{\text{excitación Clorofila}}$: 633 nm, $\lambda_{\text{emisión Clorofila}}$: 651-717).

Como se observa en la figura 4.13, las plantas transformadas con los vectores vacíos no presentaban señal de fluorescencia en el rango de detección de la YFP ó la CFP.

En la figura 4.14 se observan los resultados que mostraron las plantas de las líneas estables que expresaban la proteína FAD6 de Arabidopsis fusionada a la proteína fluorescente cian (CFP).

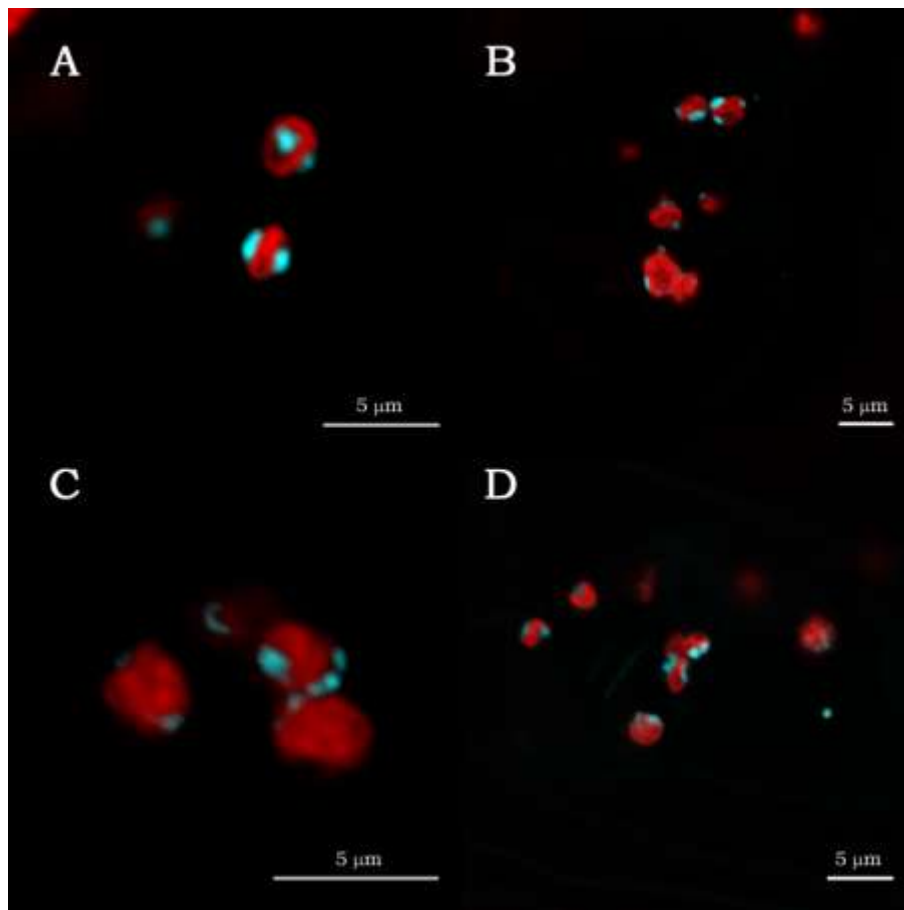


Figura 4.14 Imágenes de microscopía confocal donde se muestran superpuestas la señal emitida por la proteína fluorescente CFP fusionada a AtFAD6 (en azul), y la señal emitida por la clorofila de los cloroplastos (en rojo) ($\lambda_{\text{excitación CFP}}$: 458 nm, $\lambda_{\text{emisión CFP}}$: 465-571; $\lambda_{\text{excitación Clorofila}}$: 633 nm, $\lambda_{\text{emisión Clorofila}}$: 651-717). (A), (B) y (C) Detalles de cloroplastos del mesófilo. (D) Detalle de cloroplastos de las células guarda.

Como se observa en la figura 4.14, la señal emitida por la CFP fusionada a la proteína FAD6 se detectó en forma de puntos específicos (foci) que parecían localizarse en el contorno de los cloroplastos, tanto en cloroplastos del mesófilo como de la epidermis. Para confirmar si la señal obtenida se localizaba en el contorno del cloroplasto se tomaron imágenes de un mismo cloroplasto en diferentes planos de enfoque en el eje z (altura). Los resultados se muestran en la figura 4.15.

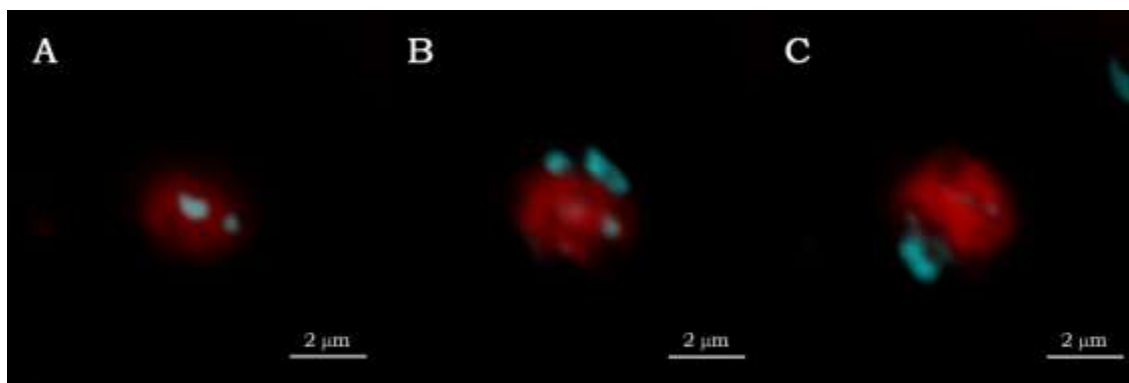


Figura 4.15 Imágenes de imágenes de microscopía confocal donde se muestran superpuestas la señal emitida por la proteína fluorescente CFP fusionada a FAD6 (en azul), y la señal emitida por la clorofila de los cloroplastos (en rojo) en un mismo cloroplasto ($\lambda_{excitación\ CFP}$: 458 nm, $\lambda_{emisión\ CFP}$: 465-571; $\lambda_{excitación\ Clorofila}$: 633 nm, $\lambda_{emisión\ Clorofila}$: 651-717). (A) Plano de enfoque superior del cloroplasto. (B) Plano de enfoque medio del cloroplasto. (C) Plano de enfoque inferior del cloroplasto.

Como se observa en la figura 4.15, la señal correspondiente a la CFP fusionada a FAD6 se localiza en el contorno del cloroplasto en todos los planos de enfoque, detectándose siempre en puntos concretos o foci. Este patrón de localización es similar al obtenido con otras proteínas localizadas en la envuelta del cloroplasto (Haswell y Meyerowitz, 2006 ; Maple y Moller, 2007 ; Burch Smith y col., 2011 ; Ruppel y col., 2011). Por tanto, los resultados sugieren la localización de FAD6 en la envuelta del cloroplasto. Estos datos son coherentes con toda la literatura anterior referida a la localización de FAD6. Además, las imágenes de microscopía confocal muestran que FAD6 no se localiza de manera homogénea en la envuelta, sino que se organiza en puntos concretos, lo cual sugiere la existencia de zonas de la envuelta cloroplástica especializadas en la actividad ω -6 desaturasa.

En la figura 4.16 se observan los resultados que mostraron las plantas de las líneas estables que expresaban la proteína FAD7 de Arabidopsis fusionada a la proteína fluorescente amarilla (YFP).

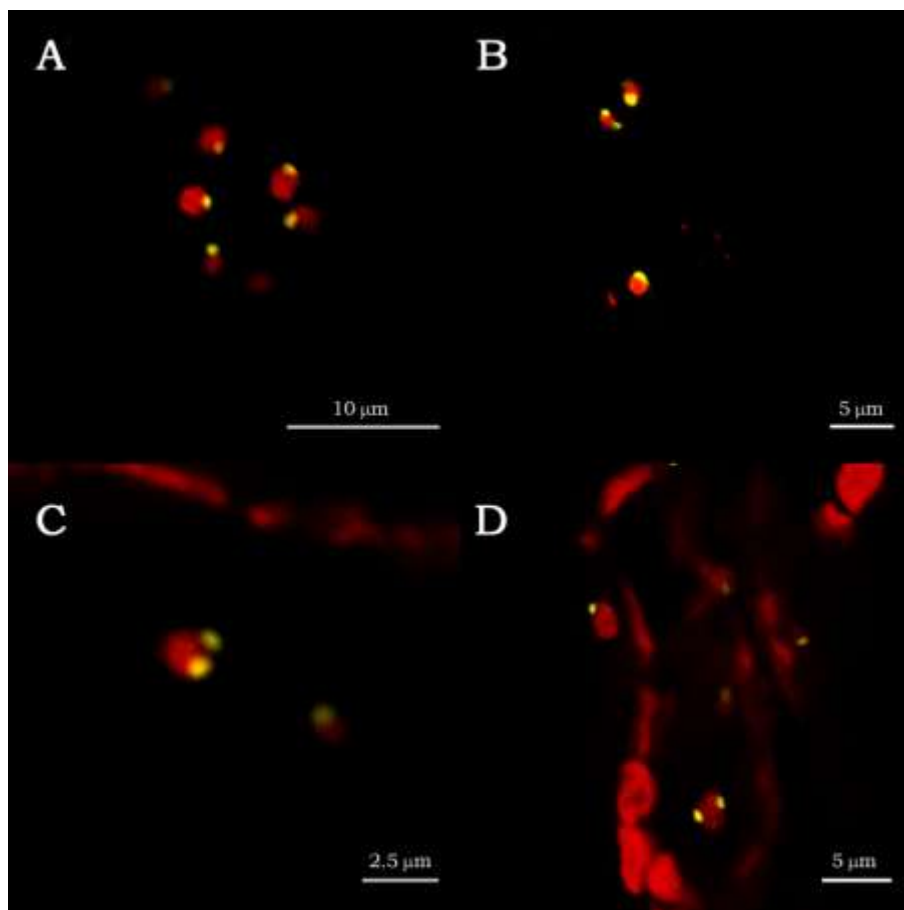


Figura 4.16 Imágenes de microscopía confocal donde se muestran superpuestas la señal emitida por la proteína fluorescente YFP fusionada a AtFAD7 (en amarillo), y la señal emitida por la clorofila de los cloroplastos (en rojo) ($\lambda_{\text{excitación YFP}}$: 514 nm, $\lambda_{\text{emisión YFP}}$: 518-580; $\lambda_{\text{excitación Clorofila}}$: 633 nm, $\lambda_{\text{emisión Clorofila}}$: 651-717). (A) Detalle de cloroplastos de las células guarda. (B), (C) y (D) Detalles de cloroplastos del mesófilo.

Como se observa en la figura 4.16, la señal emitida por la YFP fusionada a proteína FAD7 de Arabidopsis se detectó en forma de puntos específicos en el contorno de los cloroplastos, similares a los observados para FAD6. Este resultado indicó que la proteína AtFAD7 también se localiza en puntos concretos de la envuelta del cloroplasto, tanto en cloroplastos de mesófilo como de la epidermis.

Dado el patrón de localización de AtFAD6 y AtFAD7 en foci y, con objeto de confirmar los resultados obtenidos con las líneas transgénicas estables, se llevaron

a cabo experimentos de expresión transitoria de estas proteínas en hojas de *Nicotiana tabacum* (tabaco) a través de una colaboración con el Dr. Fabian E. Vaistij del grupo del Prof. Ian Graham de la Universidad de York, Inglaterra. Los resultados obtenidos mediante esta técnica se muestran en la figura 4.17.

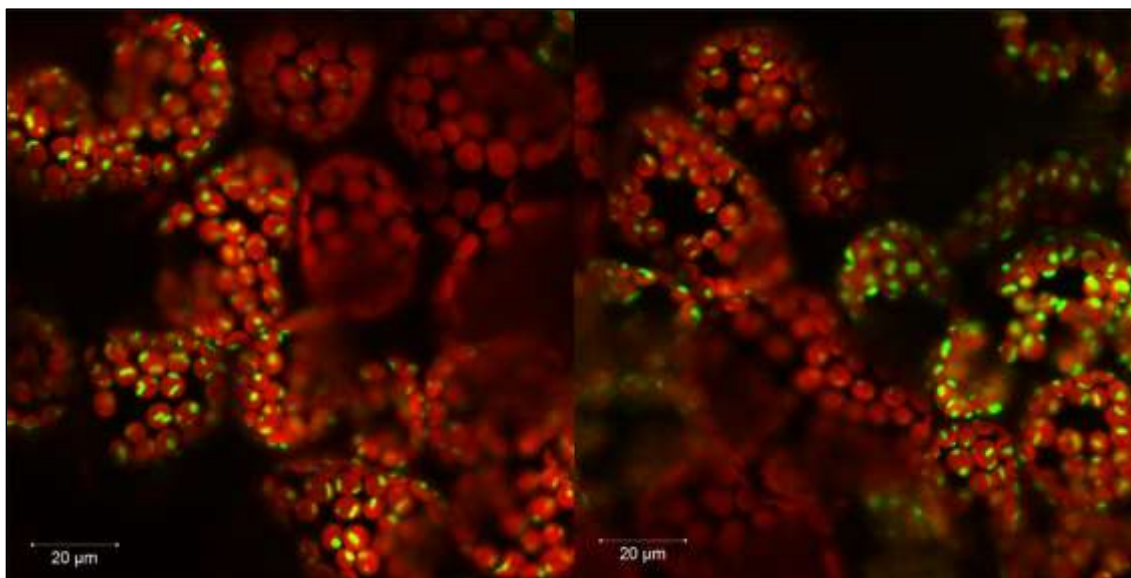


Figura 4.17 Imágenes de microscopía confocal de la expresión transitoria en hojas de tabaco de la fusión FAD7:YFP en dos zonas diferentes de células del mesófilo. En estas imágenes se muestran superpuestas la señal emitida por la proteína fluorescente YFP fusionada a AtFAD7 (en verde), y la señal emitida por la clorofila de los cloroplastos (en rojo) ($\lambda_{\text{excitación YFP}}$: 514 nm, $\lambda_{\text{emisión YFP}}$: 518-580; $\lambda_{\text{excitación Clorofila}}$: 633 nm, $\lambda_{\text{emisión Clorofila}}$: 651-717).

Como se observa en la figura 4.17, el patrón de localización de la proteína FAD7 de *Arabidopsis* utilizando la técnica de la expresión transitoria en hojas de tabaco es el mismo que el obtenido en las líneas estables de *Arabidopsis*. La señal de la proteína AtFAD7 en esta expresión transitoria se localiza de manera homogénea en todos los cloroplastos de las células de tabaco, en puntos concretos (foci) de la envuelta del cloroplasto. La obtención del mismo patrón de localización utilizando ambas técnicas de transformación en dos especies diferentes (líneas transgénicas

estables de *Arabidopsis* y expresión transitoria en tabaco) confirma el modelo de organización de estas enzimas en foci.

En el caso de las líneas estables generadas con *GmFAD7-1* y *GmFAD7-2* (ambas fusionadas con la YFP), no mostraron ninguna señal de fluorescencia (YFP) en la microscopía confocal. Esta ausencia de señal en las plantas transformadas con los genes de soja podría deberse a un fenómeno de silenciamiento del RNA llamado también co-supresión o silenciamiento génico post-transcripcional (Vance y Vaucheret, 2001). Algunos tipos de silenciamiento génico en plantas se han relacionado directamente con la expresión de los transgenes bajo la acción de promotores fuertes (Vaucheret y col., 1998). Este podría ser nuestro caso, ya que los vectores pEarleyGate portan el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV).

4.2.10. Regulación por desarrollo de los niveles de proteína

En las líneas estables de *Arabidopsis* generadas con las fusiones *AtFAD6:CFP* y *AtFAD7:YFP*, la observación al microscopio confocal de hojas de plantas de diferentes edades mostró diferencias interesantes. En las hojas de plantas jóvenes, la cantidad de cloroplastos en los que se detectaba señal de YFP era mucho mayor que en hojas de plantas maduras. Una observación más detallada de la localización de la señal de YFP ó CFP fusionadas a las proteínas de estudio, permitió localizar la señal en cloroplastos de pequeño tamaño, más abundantes en plantas jóvenes. Sin embargo en los cloroplastos más grandes, de plantas más maduras no se detectó señal. Los resultados observados en el microscopio confocal se observan en la figura 4.18, para la construcción *AtFAD7:YFP*.

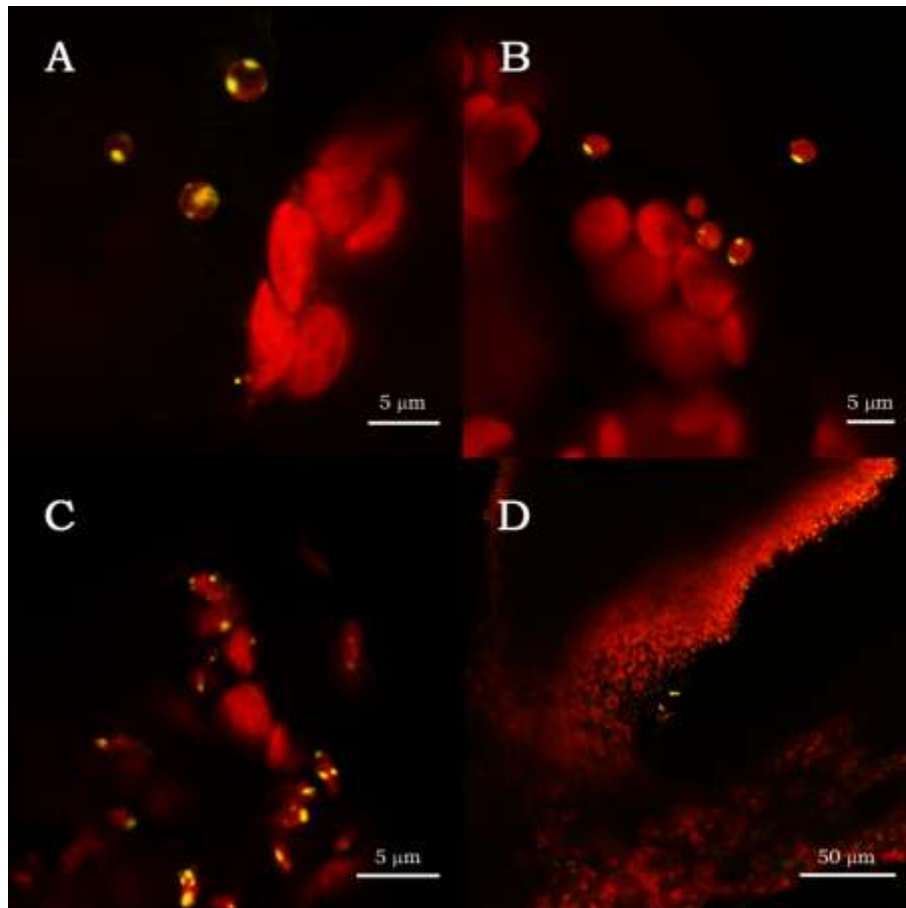


Figura 4.18 Imágenes de microscopía confocal donde se muestran superpuestas la señal emitida por la proteína fluorescente YFP fusionada a AtFAD7 (en amarillo), y la señal emitida por la clorofila de los cloroplastos (en rojo) ($\lambda_{\text{excitación YFP}}$: 514 nm, $\lambda_{\text{emisión YFP}}$: 518-580; $\lambda_{\text{excitación Clorofila}}$: 633 nm, $\lambda_{\text{emisión Clorofila}}$: 651-717). (A), (B) y (C) Cloroplastos de diferentes tamaños en detalle. (D) Imagen tomada con un objetivo de menor aumento en la que se observa en la mitad superior una hoja en desarrollo con multitud de cloroplastos pequeños.

Como se observa en la figura 4.18, la señal emitida por la YFP fusionada a la proteína FAD7 se localiza preferencialmente en los cloroplastos pequeños de plantas pequeñas. Sin embargo, en cloroplastos grandes de plantas maduras no se observa señal de YFP. Las plantas con la fusión AtFAD6:CFP mostraban este mismo patrón al microscopio. Estos resultados sugerían que las proteínas FAD6 y FAD7

podrían acumularse de manera preferencial en cloroplastos pequeños de hojas jóvenes.

Para confirmar si el desarrollo de cloroplasto influía en la presencia de las proteínas AtFAD6:CFP y AtFAD7:YFP se decidió detectar éstas proteínas mediante western blot utilizando muestras de plantas de diferentes edades (10 y 45 días). En la figura 4.19 se muestra el western blot realizado con el anticuerpo policlonal antiGFP (ab290, Abcam) que reconoce también las proteínas CFP e YFP.

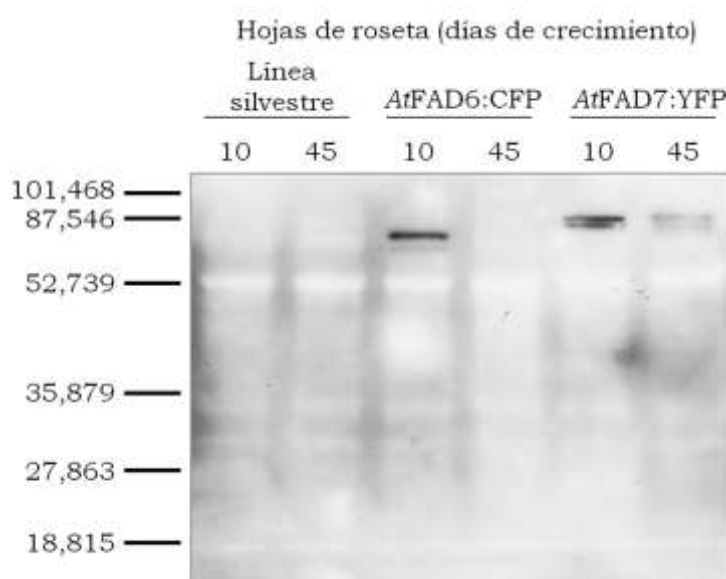


Figura 4.19 Western blot con antiGFP ab290 de Abcam (dilución 1:2000) de extractos de proteína total de plantas de 10 y 45 días, tanto de la línea silvestre como de las líneas estables AtFAD6:CFP y AtFAD7:YFP. El anticuerpo secundario utilizado fue el goat anti-rabbit de Agrisera (dilución 1:25000). Para la realización de este western blot se cargaron 5 µg de proteína total de cada fracción.

Como se observa en la figura 4.19, se detectaron unas bandas (70-90 kDa) en los carriles correspondientes a las plantas jóvenes de AtFAD6:CFP y AtFAD7:YFP. El tamaño de estas bandas sería compatible con las fusiones realizadas entre las proteínas FAD y las proteínas fluorescentes. Es necesario remarcar que se observó

una diferencia de tamaño entre la banda correspondiente a la fusión *AtFAD6:CFP* y la correspondiente a la fusión *AtFAD7:YFP*, siendo la primera aparentemente más pequeña. Sorprendentemente, para ambas proteínas FAD se predice un péptido señal cloroplástico de longitud similar (78 aminoácidos para *AtFAD6* y 81 aminoácidos para *AtFAD7*). Además, el peso molecular teórico de ambas proteínas FAD es similar (unos 51 kDa con péptido señal y unos 42-43 kDa sin péptido señal) así como también lo es el peso molecular de las proteínas fluorescentes (ambas unos 27 kDa). Dada la elevada similitud entre los pesos moleculares de ambas fusiones de proteínas no se puede apelar a éstos como explicación a las diferencias de tamaño observadas. Una explicación para esta diferencia de tamaño observada en el western blot sería que existiera un procesamiento del péptido señal de *AtFAD6* y por lo contrario, este procesamiento no se produjera en *AtFAD7*. Sin embargo, dado que la proteína *AtFAD7:YFP* se localiza en el cloroplasto, esta ausencia de procesamiento del péptido señal, si existiera, no afectaría a la inserción de la proteína en la membrana.

Sin embargo, la banda de 70-90 kDa no se observaba (o se observaba de forma menos intensa) en los carriles correspondientes a las plantas maduras y tampoco en las plantas de la línea silvestre (control negativo). Estos resultados corroboran las observaciones hechas en el microscopio confocal y sugieren que existe un patrón de acumulación de las proteínas *AtFAD6:CFP* y *AtFAD7:YFP* dependiente del desarrollo de la hoja.

4.2.11. Discusión

El conocimiento sobre la localización de las desaturasas de plantas es importante para la comprensión de su funcionamiento, organización y participación en las rutas de síntesis de ácidos grasos. Los datos obtenidos durante la realización de esta Tesis Doctoral confirman la localización cloroplástica de las proteínas FAD6 y FAD7 de *Arabidopsis* y sugieren que la distribución de estas enzimas en la membrana se restringe a zonas concretas de la envuelta cloroplástica (foci). El patrón de localización encontrado para AtFAD6 y AtFAD7, ha sido descrito para otras proteínas de la envuelta cloroplástica (Haswell y Meyerowitz, 2006 ; Maple y Moller, 2007 ; Burch Smith y col., 2011 ; Ruppel y col., 2011) y esta organización en foci sugiere la existencia de áreas de la envuelta cloroplástica especializadas en la desaturación de ácidos grasos.

La observación del mismo tipo de patrón para FAD6 y FAD7 abre la posibilidad de que ambas se localicen en las mismas zonas de la envuelta cloroplástica, generando no sólo zonas especializadas en una reacción particular de desaturación, sino áreas especializadas en la desaturación de ácidos grasos en la membrana, siendo posible incluso, que ambas proteínas interaccionen para desarrollar su función. En virtud de los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral proponemos dos posibles modelos de distribución y organización de estas enzimas en la envuelta cloroplástica. Los modelos que se proponen están resumidos en la figura 4.20.

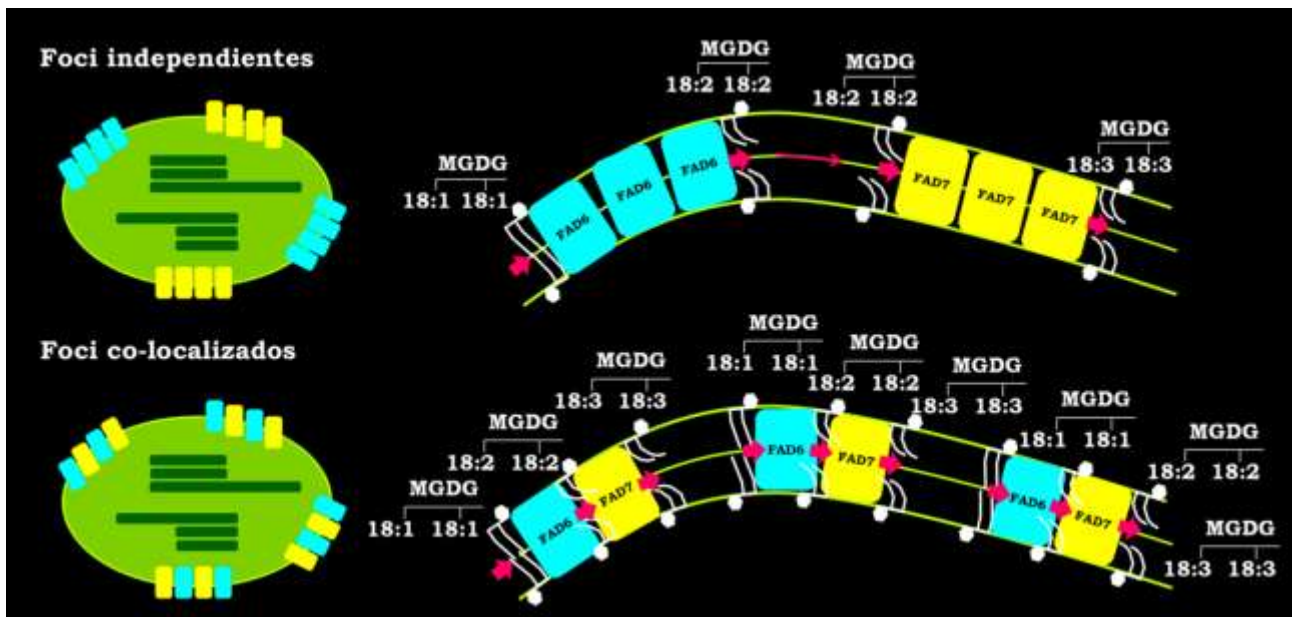


Figura 4.20 Modelos de distribución y organización en la envuelta cloroplástica propuestos para las desaturasas AtFAD6 y AtFAD7.

Como se muestra en la figura 4.20, y dados los patrones individuales de localización de las proteínas AtFAD6 y AtFAD7, se proponen dos modelos de distribución y organización de estas dos enzimas en la envuelta cloroplástica. El “modelo de foci independientes” se caracteriza por la localización de ambas proteínas en zonas concretas de la envuelta cloroplástica independientes entre sí. En este modelo no existiría interacción física entre las proteínas AtFAD6 y AtFAD7 y conllevaría un movimiento de los lípidos por la membrana de la “zona de desaturación ω -6” a la “zona de desaturación ω -3”. El “modelo de foci co-localizados” se caracteriza por la localización de ambas proteínas en las mismas zonas concretas de la envuelta cloroplástica. En este modelo podría existir una interacción física entre las proteínas AtFAD6 y AtFAD7 con el objeto de sintetizar de manera coordinada los ácidos grasos poliinsaturados en el cloroplasto, y además no precisaría del movimiento de los lípidos de una zona de desaturación en la membrana a otra.

La validación de estos modelos se podría realizar utilizando las técnicas de FRET (Förster Resonance Energy Transfer) o BiFC (Bimolecular Fluorescence Complementation) para evaluar la posible interacción entre FAD6 y FAD7. Los estudios de topología transmembrana mostrados en la introducción general (apartado 1.4.1.2) mostraron que para los dos programas utilizados, los extremos C-terminales de las proteínas de estudio (*AtFAD6* y *AtFAD7*) estaban localizados hacia el mismo lado de la membrana, apoyando el uso de la técnicas de FRET o BiCF para el estudio de la posible interacción entre *AtFAD6* y *AtFAD7*.

Por otra parte, la elevada proporción de señal detectada en cloroplastos de hojas de plantas jóvenes respecto a la que detectada en cloroplastos de hojas de plantas maduras lleva a pensar que existe un control sobre la traducción o la vida media de estas proteínas que depende del estado de desarrollo de los cloroplastos. Los resultados mostrados en la discusión del primer capítulo de resultados (apartado 4.1.8) sobre la expresión de las ω -3 desaturasas plastidiales en *Arabidopsis* sugerían una posible regulación post-transcripcional, que en el caso de FAD7 ya ha sido descrita a nivel de mRNA en cultivos celulares de soja (Collados y col., 2006). Los datos disponibles sobre *AtFAD6* durante el desarrollo de la hoja en la base de datos eFP Browser sugieren que la expresión de este gen es mayor en hojas jóvenes que en hojas maduras, lo cual presenta mayor correlación con los datos de proteína presentados en esta Tesis Doctoral. Los resultados obtenidos hasta el momento con las líneas transgénicas *AtFAD6:CFP* y *AtFAD7:YFP* sugieren que existe un mecanismo de regulación que controla los niveles de proteína disponible que se podría correlacionar con la producción de lípidos cloroplásticos con elevado grado de insaturación durante la maduración foliar (Horiguchi y col., 1996b). Estos datos sugieren que la actividad de las ω -6 y ω -3 desaturasas plastidiales es de mayor relevancia al comienzo del desarrollo de las hojas, y que conforme éstas se desarrollan la presencia de estas enzimas es menos importante.

4.3. EL ÁCIDO GRASO HEXADECATRIENOICO (16:3) COMO PRECURSOR DE LA SÍNTESIS DE JASMONATOS

Las oxilipinas son una amplia familia de compuestos derivados de los ácidos grasos poliinsaturados que generalmente actúan como moléculas señalizadoras (fitohormonas) controlando procesos muy diversos tales como, la respuesta a estrés biótico o abiótico o el desarrollo y el crecimiento de los tejidos vegetales (Feussner y Wasternack, 2002 ; Schaller y Stintzi, 2009). Las oxilipinas más conocidas y mejor caracterizadas son las pertenecientes a la familia de los jasmonatos. Su síntesis tiene su origen en los 9- ó 13- hidroperóxidos generados a partir de los ácidos grasos poliinsaturados cloroplásticos, pues las enzimas responsables de las etapas iniciales de su síntesis se han localizado en este orgánulo (Ishiguro y col., 2001). Los jasmonatos son moléculas clave en la defensa de las plantas frente al ataque de herbívoros y patógenos (tanto específicos de hoja como de raíz) (Acosta y Farmer, 2010) y también juegan un papel importante en el desarrollo vegetal. Así, son esenciales para el correcto desarrollo de los estambres y su ausencia provoca esterilidad masculina; además participan en la regulación del tamaño del peciolo, de las semillas, de los pétalos y afectan a la estructura del tejido conductor (Acosta y Farmer, 2010).

4.3.1. Lipasas implicadas en la liberación de los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos de membrana

El primer paso para la síntesis de oxilipinas, consiste en la separación de los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos a los que se encuentran esterificados. Por analogía a la ruta de biosíntesis de eicosanoides en mamíferos (moléculas similares a los jasmonatos en plantas), se postuló que es una enzima fosfolipasa de tipo A la que produce la liberación de los ácidos grasos poliinsaturados de los

lípidos para la síntesis de los peróxidos (Narváez-Vásquez y col., 1999 ; Schaller, 2001), aunque se han descrito un gran número de enzimas (hasta 46) que podrían ser responsables de este proceso (Delker y col., 2006). Entre todas ellas se encuentran enzimas fosfolipasas A1 y A2 (específicas de las posiciones sn-1 y sn-2 del glicerol, respectivamente), acyl-hidrolasas similares a la proteína “patatin”, lipasas similares a DAD (Defective in Anther Dehiscence) y acil-hidrolasas similares a SAG (Senescence Associated Gene) (Delker y col., 2006). A nivel experimental se ha detectado el aumento de la actividad fosfolipasa A en células de tabaco y en plantas de soja sometidas al tratamiento con diferentes moléculas estimulantes de la respuesta a la defensa en plantas (Roy y col., 1995 ; Chandra y col., 1996). Sin embargo, la mayor parte de los ácidos grasos poliinsaturados en plantas se encuentran asociados a los galactolípidos, y éstos se localizan en el cloroplasto, lugar de inicio de la síntesis de los derivados hidroperoxidados y de los jasmonatos (Schaller, 2001). En *Arabidopsis*, se ha descrito la existencia de enzimas galactolipasas como la denominada DONGLE (DGL) que posee más especificidad por los galactolípidos que la que posee la fosfolipasa DAD1 descrita hasta el momento (Ishiguro y col., 2001 ; Hyun y col., 2008). Ambas enzimas pertenecen a una amplia familia de genes que codifican lipasas denominada AtPLA₁-I (fosfolipasas A1, tipo I), y de modo más reciente se ha visto que existen otras enzimas, diferentes a DGL y DAD1, que realizan funciones redundantes a las descritas para éstas (Ellinger y col., 2010). Debe hacerse notar que el 16:3 se localiza preferencialmente en los lípidos en posición sn-2, de un modo diferente al 18:3, que se encuentra en ambas posiciones, de lo cual se deduce que las lipasas que actúan sobre cada uno de ellos podrían ser diferentes. Si fuera así, la regulación de estas enzimas podría ser clave en la síntesis de ácido 12-oxo fitodienoico (OPDA) y ácido dinor-oxo fitodinenoico (dnOPDA) y su colaboración individual a la síntesis de ácido jasmónico (JA).

4.3.2. Reacciones de peroxidación de lípidos. Enzimas implicadas.

Una vez liberados los ácidos grasos poliinsaturados de los lípidos a los que están esterificados, se llevan a cabo diversas reacciones de hidroperoxidación de los mismos en respuesta a diferentes estímulos. Las diferentes reacciones de hidroperoxidación de los ácidos grasos poliinsaturados se resumen a continuación en la figura 4.1.

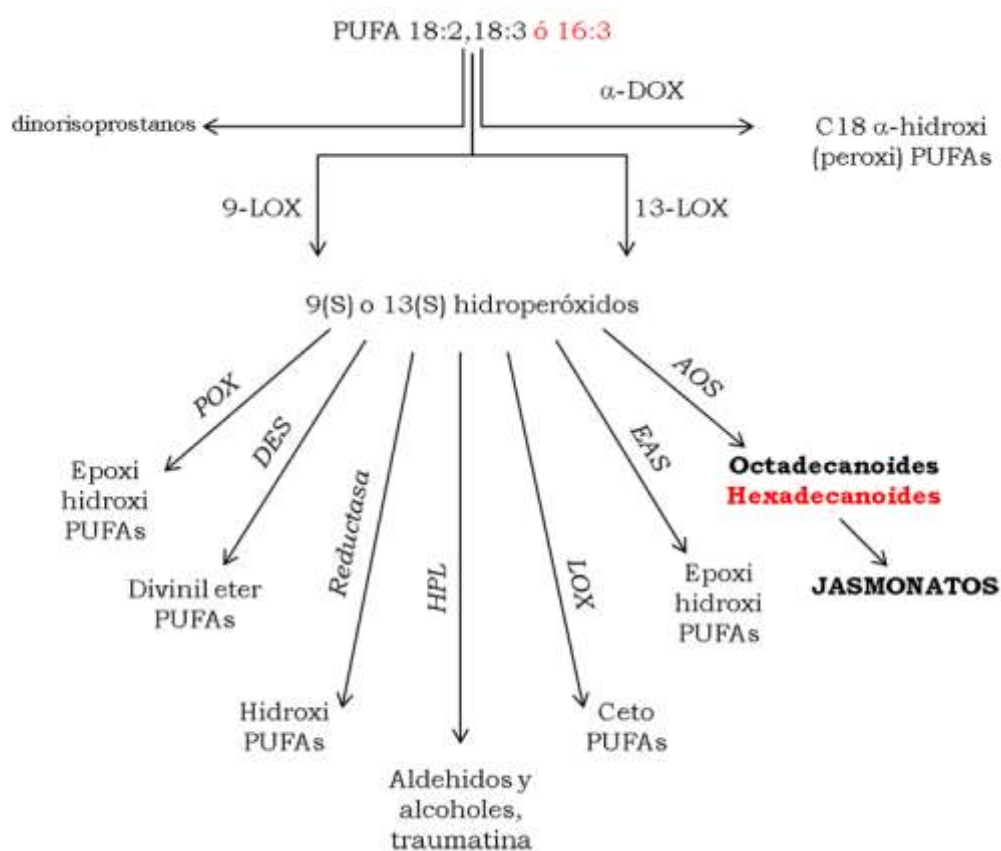


Figura 4.1 Metabolismo de los ácidos grasos poliinsaturados que da lugar a los derivados hidroperoxidados en *Arabidopsis*, principalmente a través de la acción de las enzimas 9-LOX y 13-LOX en plantas. POX (Hidroperóxido isomerasa o Peroxigenasa), AOS (Óxido de Aleno Sintasa), DOX (Dioxigenasa), DES (Divinil Éter Sintasa), EAS (Epoxi Alcohol Sintasa), HPL (Hidroperóxido Liasa); LOX (Lipoxigenasa). Extraída y adaptada de (Feussner y Wasternack, 2002).

Como se observa en la figura 4.1, los ácidos grasos poliinsaturados pueden dar lugar a hidroperóxidos que son posteriormente modificados hasta dinorisoprostanos (también fitoprostanos) mediante reacciones no enzimáticas (Parchmann y Mueller, 1998). En plantas, se ha observado el aumento de los niveles de estas moléculas, de estructura similar a las prostaglandinas, en condiciones de estrés oxidativo y en herida (Imbusch y Mueller, 2000). Esto las convierte en buenos sensores del daño oxidativo al igual que en animales, sin embargo, su posible actividad biológica es desconocida (Imbusch y Mueller, 2000). Los ácidos grasos poliinsaturados también pueden transformarse en hidroperóxidos mediante la acción de enzimas α -dioxigenasas (Hamberg y col., 1999). Los productos de esta reacción se han relacionado con las reacciones de la planta en defensa al ataque por patógenos (Hamberg y col., 1999).

Sin embargo, los hidroperóxidos producidos de manera mayoritaria en plantas provienen de la actividad de las enzimas lipoxigenasas 9-LOX y 13-LOX (Feussner y Wasternack, 2002). Estos hidroperóxidos son posteriormente metabolizados por diferentes reacciones secundarias (figura 4.1). Los compuestos producidos mediante la acción de la enzima peroxigenasa (POX) tienen la misma composición molecular que los producidos mediante la acción de la enzima epoxi alcohol sintasa (EAS). Sin embargo, su estructura tridimensional es diferente debido a la estereoquímica. Ambos tipos de compuestos se han relacionado con las reacciones de defensa frente al ataque de patógenos, aunque los derivados de la acción de la enzima epoxi alcohol sintasa (EAS) sólo se han encontrado en solanáceas (Sanz y col., 1998 ; Hamberg y col., 1999). Menos se conoce de la biosíntesis de los hidroxiácidos grasos producidos por la enzima hidroperóxido-reductasa. Se sabe que éstos son capaces de activar genes de respuesta a patógenos y que, en semillas, parecen ser intermediarios en la degradación de los lípidos de reserva (Weichert y col., 1999 ; Feussner y Wasternack, 2002). También se ha descrito la

transformación de los hidroperóxidos en alcoxiradicales a través de enzimas lipoxigenasas, aunque el papel fisiológico de estas moléculas es, a día de hoy, desconocido (Kuhn y col., 1991 ; Feussner y Wasternack, 2002).

Los otros tres tipos de reacciones secundarias de transformación de los hidroperóxidos se llevan a cabo por una familia atípica de enzimas monooxigenasas (CYP74s), que consta de tres subfamilias diferentes: AOS (Aleno Óxido Sintasa), HPL (Hidroperóxido Liasa) y DES (Divinil Éter Sintasa). Estas enzimas se caracterizan por no requerir oxígeno molecular ni reductasas del tipo citocromo P450 dependientes de NADP(H) y los nuevos enlaces carbono-oxígeno se generan utilizando hidroperóxidos tanto como sustratos, como donadores de oxígeno (Nelson, 1999 ; Noordermeer y col., 2001 ; Feussner y Wasternack, 2002). De la subfamilia DES se han clonado los cDNAs de patata (*Solanum tuberosum*), tomate (*Lycopersicum esculentum*) y *Physcomitrella patens* (Itoh y Howe, 2001 ; Stumpe y col., 2001 ; Feussner y Wasternack, 2002), la actividad de estas enzimas se detectó en envueltas del cloroplasto (Blee y Joyard, 1996) y se relacionó con la defensa contra patógenos, tales como *Phytophthora infestans*, en plantas de patata debido a que se detectaron altos niveles de sus productos de reacción, ácido colnelénico (CnA) y ácido colneleico (CA), después de la infección (Weber y col., 1999).

De la subfamilia HPL se ha clonado un único cDNA en la mayoría de las plantas, como en *Lycopersicum esculentum* (tomate), *Solanum tuberosum* (patata), *Capsicum annuum* (pimiento) o *Arabidopsis* (Bate y col., 1998 ; Matsui y col., 1999 ; Feussner y Wasternack, 2002), aunque en otras, como *Medicago truncatula*, se han detectado varios genes HPL. La enzima de *Arabidopsis* (*AtHPL*) es específica para los 13-hidroperóxidos, denominándola 13-HPL, aunque en otras especies se han identificado enzimas que no muestran especificidad para los compuestos hidroperoxidados en posición 9 ó 13, denominándolas 9/13-HPL (Feussner y Wasternack, 2002). La actividad HPL se localizó en primer lugar en los cloroplastos

(Vick y Zimmerman, 1987) y posteriormente se confirmó su localización en la envuelta externa del cloroplasto mediante la expresión *in vitro* del gen de tomate y posterior fraccionamiento cloroplástico (Froehlich y col., 2001b). La actividad de estas enzimas produce la síntesis de aldehídos y alcoholes de cadena corta, de características volátiles como el (3Z)-hexenal y (3Z)-hexenol, que son responsables principalmente del aroma de frutos y flores. Los productos de la actividad HPL también juegan un papel en la defensa de las plantas al ataque por patógenos. Este hecho fue demostrado en plantas de patata en las que la expresión del gen se inhibió mediante el uso de RNAs anti-sentido (Vancanneyt y col., 2001).

Con respecto a la subfamilia AOS, en la mayoría de especies como en *Linum usitatissimum* (lino) o *Arabidopsis*, también se ha identificado únicamente un gen AOS (Laudert y col., 1996 ; Feussner y Wasternack, 2002) y se ha descrito que la mayoría de estas enzimas son específicas para los 13-hidroperóxidos denominándolas 13-AOS. Sin embargo también se han descrito enzimas de los tipos 9-AOS y 9/13-AOS en otras especies como *Hordeum vulgare* (cebada) o *Physcomytrella patens* (Maucher y col., 2000 ; Feussner y Wasternack, 2002). Su actividad también fue vinculada en primer lugar a los cloroplastos (Vick y Zimmerman, 1987). Esta localización fue posteriormente comprobada por inmunocitoquímica en cebada (Maucher y col., 2000). De un modo más concreto, la enzima se localizó en la envuelta interna del cloroplasto mediante expresión *in vitro* del gen de tomate y posterior fraccionamiento cloroplástico (Froehlich y col., 2001b). La expresión constitutiva del gen *AtAOS* tanto en plantas de *Arabidopsis* como de patata, únicamente provocó el aumento de los niveles de JA en las plantas sometidas a herida (Laudert y col., 2000). Sin embargo, la expresión del gen de lino (*Linum usitatissimum*) en plantas de patata provocó el aumento de los niveles basales de JA, aunque este aumento no tuvo como respuesta la habitual expresión de los genes inducidos por jasmónico, sugiriendo que estos niveles están

controlados a través de algún mecanismo de secuestro de la molécula (Harms y col., 1995). Todos estos datos sugieren que la regulación de la expresión y función del gen AOS puede ser diferente entre especies, incluso aunque las enzimas sean específicas del mismo tipo de productos como es el caso entre Arabidopsis y lino, ambas del tipo 13-AOS (Feussner y Wasternack, 2002).

4.3.3. Biosíntesis de Jasmonatos en plantas. Enzimas implicadas.

La síntesis de estas moléculas comienza en el cloroplasto a través de la acción de las enzimas Lipoxigenasa (LOX) y Aleno Óxido Sintasa (AOS) que actúan ambas sobre ácidos grasos poliinsaturados como el 18:3 o el 16:3. El esquema de las reacciones que se llevan a cabo se muestra en la figura 4.2.

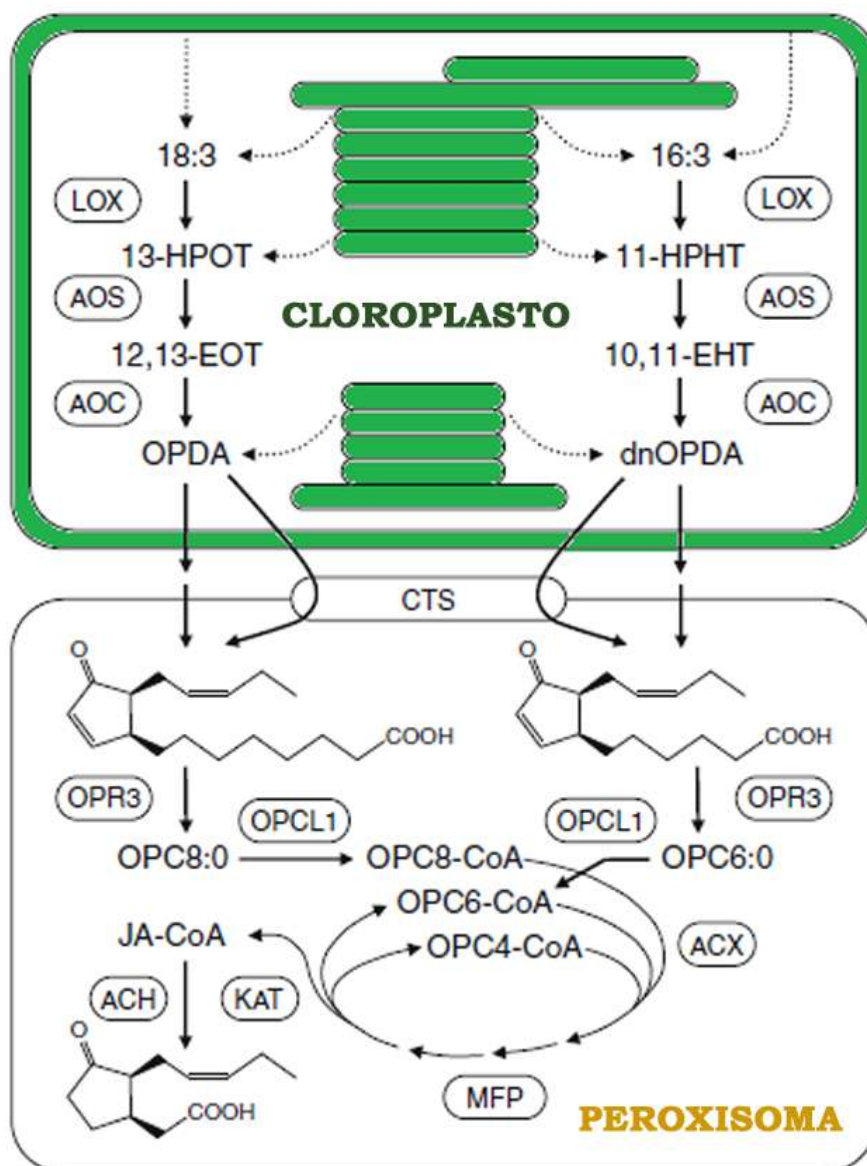


Figura 4.2 Esquema de las reacciones de síntesis de jasmonatos que se llevan a cabo en cloroplastos y peroxisomas. Extraída y adaptada de (Schaller y Stintzi, 2009).

Como se observa en la figura 4.2, sobre los ácidos grasos poliinsaturados actúan las enzimas LOX, AOS y AOC que transforman éstos en ácido 12-oxofitodienoico (OPDA) ó ácido dinor-oxofitodienoico (dnOPDA) en el cloroplasto, dependiendo de que utilicen $18:3$ o $16:3$ como sustrato. Estos compuestos son posteriormente transportados a los peroxisomas, donde es sintetizado finalmente el

ácido jasmónico (JA). Se han descrito 6 genes LOX (Linoleate Oxygen Oxidoreductase) en *Arabidopsis*, de ellos, LOX1 y LOX5 se ha comprobado que son 9-lipoxigenasas, el resto (LOX2, LOX3, LOX4 y LOX6) son 13-lipoxigenasas (Bannenberg y col., 2009). Debido a que las enzimas responsables de la síntesis de jasmonatos son las 13-lipoxigenasas, los estudios sobre las enzimas 9-lipoxigenasas son minoritarios, aunque de modo reciente se han descrito los productos de su reacción como posibles moduladores del desarrollo de raíces secundarias (Vellosillo y col., 2007) y su papel en la síntesis de oxilipinas o su interacción con otras hormonas vegetales como el etileno es de interés creciente (Bannenberg y col., 2009 ; López y col., 2011). De los genes *LOX2*, *LOX3*, *LOX4* y *LOX6*, responsables de la síntesis de los derivados 13-hidroperoxidados, se conoce que el gen *LOX2* se activa por aplicación de metiljasmonato (MeJA) y se inhibe durante la senescencia (Bell y Mullet, 1993). La proteína LOX2 se ha localizado en cloroplastos (envuelta y tilacoides) y se conoce que es esencial para la síntesis de ácido jasmónico durante la herida (Bell y col., 1995). En el caso del gen *LOX3*, se ha visto que se expresa en raíz y que existe inducción de su expresión durante la senescencia (al igual que *LOX4*) (He y col., 2002) y tras la aplicación exógena de JA (Chung y col., 2008). Aunque se tiende a pensar que las células con cloroplastos son las principales responsables de la síntesis de jasmonatos, estas moléculas también se detectan en la raíz (Staswick, 2009). De hecho también podrían formar parte de los mecanismos de defensa frente a patógenos de la raíz.

Como se ha visto anteriormente, únicamente se ha descrito un gen AOS (Aleno Óxido Sintasa) en *Arabidopsis* (Laudert y col., 1996). La identificación del gen AOS en *Arabidopsis* y el aislamiento del correspondiente mutante permitió llegar a la conclusión de que su actividad es esencial para la síntesis de todos los compuestos biológicamente activos del tipo jasmonatos (Park y col., 2002). El mutante *aos* no sintetiza JA ni siquiera tras someter las plantas a herida, además posee esterilidad

masculina y es incapaz de dar semillas viables si no es suplementado con JA (Park y col., 2002). Los datos presentados en el trabajo de Park y col., (2002) sugieren que el nivel de sustrato utilizado por la proteína AOS (suministrado gracias a la acción de las lipasas y lipoxigenasas) determina el nivel de JA en plantas control, sin embargo, en plantas sometidas a herida, los niveles de expresión del gen AOS limitan el contenido final de JA.

La enzima AOC (Aleno Óxido Ciclasa) es la encargada de sintetizar los primeros compuestos cíclicos y biológicamente activos en la ruta de síntesis de jasmonico, el OPDA y el dnOPDA (Schaller y col., 2008). De la familia AOC se han descrito cuatro genes en *Arabidopsis*, (Stenzel y col., 2003) aunque en otras especies se ha identificado únicamente uno (Schaller y col., 2008). En estudios recientes se ha visto que los transcritos pertenecientes a los cuatro genes identificados en *Arabidopsis* (*AOC1*, *AOC2*, *AOC3* y *AOC4*) poseían un patrón de expresión específico de tejido (Stenzel y col., 2012). Además, las fusiones de los cuatro promotores de estos genes al gen reportero GUS (glucuronidasa) mostraron algunas similitudes de expresión entre genes (Stenzel y col., 2012). Únicamente las fusiones de *AOC3* y *AOC4* con GUS mostraban actividad del promotor en raíces, que en el caso de *AOC4* era específica del tejido vascular, sugiriendo una especificidad de tejido de este gen (Stenzel y col., 2012). En el caso de hojas, la actividad de los promotores de *AOC1*, *AOC2* y *AOC3* era similar, sugiriendo un solapamiento de funciones de estos genes (Stenzel y col., 2012). En las flores se detectó parcialmente la actividad de *AOC1* y *AOC4*. Sin embargo, el análisis de mutantes simples y dobles permitió comprobar que existía una redundancia en la función de estas enzimas debido a la ausencia de fenotipo de todos ellos (Stenzel y col., 2012). Todos los datos sobre las enzimas AOC en *Arabidopsis* sugieren, además de la redundancia en su función, que la expresión diferencial de sus genes podría ser un mecanismo integrado de regulación de la síntesis de jasmonatos en los diferentes tejidos vegetales (Stenzel y col., 2012).

Una vez finalizadas las reacciones que tienen lugar en el cloroplasto, tanto el OPDA como el dnOPDA son trasladados hacia los peroxisomas, aunque se desconoce el modo en el que estas moléculas son transportadas (en modo libre o esterificadas a acyl-CoA) (Schaller y Stintzi, 2009). Sí que se conoce uno de los métodos de transporte de estas moléculas al interior de los peroxisomas, el transportador de membrana de tipo ABC denominado COMATOSE (CTS) (Footitt y col., 2002), PXA1 (Zolman y col., 2001) ó PED3 (Hayashi y col., 2002), que es el encargado de transportar, entre otras moléculas, OPDA y dnOPDA (Schaller y Stintzi, 2009). Como los mutantes *pxa1* aún poseen niveles residuales de JA, se ha postulado una ruta alternativa de entrada de las moléculas de (dn)OPDA al peroxisoma. Esta ruta alternativa podría basarse en un mecanismo pasivo consecuencia de la diferencia de pH entre el citosol y el interior del peroxisoma (Theodoulou y col., 2005).

Una vez que el OPDA y el dnOPDA se encuentran en el interior del peroxisoma, son transformados por la enzima 12-oxofitodienoato reductasa 3 (OPR3) en ácido 3-oxo-2-(2'(Z)-pentenil)-ciclopentano-1-octanoico (OPC-8:0, del OPDA) ó en ácido 3-oxo-2-(2'(Z)-pentenil)-ciclopentano-1-hexanoico (OPC-6:0, del dnOPDA) (Schaller y Stintzi, 2009). En *Arabidopsis* se han descrito 3 genes que codifican para este tipo de reductasas (*OPR1*, *OPR2* y *OPR3*) (Schaller y Weiler, 1997 ; Biesgen y Weiler, 1999), sin embargo un estudio de especificidad de sustrato demostró que sólo OPR3 participaba en la ruta de síntesis de jasmonatos ya que es la única capaz de transformar el isómero que ocurre de manera natural en las plantas (Schaller y col., 2000). Se ha visto que el gen *OPR3* es inducido por el tratamiento con brasinosteroides, la herida e incluso los estímulos como el viento o el tacto (Mussig y col., 2000 ; Schaller y col., 2000). Los intermedios de reacción OPC-8:0 y OPC-6:0 son esterificados a acil-CoA antes de los 2 ó 3 ciclos de β -oxidación que sufren para dar lugar finalmente al ácido jasmónico. El OPDA requiere 3 ciclos de β -oxidación y

el dnOPDA únicamente 2, ya que posee 2 carbonos menos. Aunque en *Arabidopsis* existen numerosas enzimas potencialmente relacionadas con la reacción de acilación sobre OPDA y dnOPDA, únicamente se ha confirmado experimentalmente la participación de OPCL1 (Koo y col., 2006). Las sucesivas reacciones de β -oxidación de los compuestos OPC-8:0 y OPC-6:0 requieren de la coordinación de tres enzimas, la enzima acil-CoA oxidasa (ACX), una proteína multifuncional (MFP, que posee actividad enoil-CoA hidratasa y β -hidroxiacil-CoA deshidrogenasa) y 3-cetoacil-CoA tiolasa (KAT) (Schaller y Stintzi, 2009). En *Arabidopsis* existen cinco genes ACX, aunque únicamente *ACX1* y *ACX5* se han relacionado con la síntesis de jasmónico (Schilmiller y Howe, 2007). En el caso de las proteínas MFP, existen dos genes en *Arabidopsis* *AIM1* y *MFP2* y ambos se han relacionado con la síntesis de jasmónico, con actividades parcialmente solapadas (Rylott y col., 2006). Los intentos fallidos de obtención del doble mutante *aim1/mfp2* demostraron que ambas proteínas (y las reacciones de β -oxidación) son esenciales para el desarrollo y la viabilidad de las semillas (Rylott y col., 2006). De los cinco genes KAT que existen en *Arabidopsis* (*KAT1*, *KAT2*, *KAT3*, *KAT4* y *KAT5*), únicamente *KAT2* ha sido relacionado hasta el momento con la síntesis de JA (Castillo y col., 2004). La molécula de jasmonoil-CoA sintetizada tras estos pasos es posteriormente hidrolizada para liberar el ácido jasmónico. Se han identificado varios genes candidatos para esta función, sin embargo no se ha demostrado aún la implicación directa de alguno de ellos en la síntesis de JA (Tilton y col., 2004 ; Schaller y Stintzi, 2009).

4.3.4. Los Arabidósidos

Las oxilipinas OPDA y dnOPDA no se encuentran únicamente en estado libre, sino también esterificadas a galactolípidos formando los denominados Arabidósidos, que se han identificado en grandes cantidades en *Arabidopsis*

thaliana y en otras crucíferas relacionadas (Acosta y Farmer, 2010). Existen diferentes tipos de Arabidópsidos dependiendo del tipo y número de oxilipinas esterificadas al galactolípido, como el Arabidópsido E que posee dos moléculas de OPDA y una de dnOPDA (Kourtchenko y col., 2007), y también se han identificado liso-Arabidópsidos que sólo poseen una molécula de oxilipina esterificada al esqueleto de glicerol (Glauser y col., 2008 ; Glauser y col., 2009). Estos Arabidópsidos actuarían como reserva de moléculas para la síntesis de jasmónico, y además tendrían actividad como sustancias anti-patogénicas (Kourtchenko y col., 2007). Evidentemente, la presencia de las oxilipinas OPDA y dnOPDA en los galactolípidos aporta un nuevo significado para las enzimas galactolipasas encontradas en Arabidopsis (Hyun y col., 2008), pues su función bien podría ser la de liberar estas oxilipinas cuando fueran necesarias en estado libre y no únicamente la de liberar los ácidos grasos de galactolípidos.

4.3.5. Respuestas desencadenadas por jasmonatos

Las respuestas de las plantas a la herida o al ataque por patógenos incluyen la alteración del crecimiento vegetal, el incremento del número de tricomas y la liberación de compuestos de defensa. Todos estos procesos requieren una estrecha regulación de diversas rutas de señalización (Mosblech y col., 2011). Una molécula clave en el desarrollo de este tipo de respuestas es el ácido jasmónico (JA). El JA sintetizado en los peroxisomas es posteriormente modificado para dar lugar a compuestos con mayor actividad biológica, el conjugado ácido jasmónico-isoleucina (JA-Ile) en hojas (Mosblech y col., 2011) y el conjugado ácido jasmónico-triptófano (JA-Trp) en raíces (Staswick, 2009). Este compuesto conjugado se une a la proteína CORONATINE INSENSITIVE 1 (COI1) formando un complejo que de manera integrada con otras proteínas (COI1-Skp1-Cull1-F-box-(SCF), complejo ubiquitina E3 ligasa), reconoce diferentes proteínas diana que son enviadas a la degradación

en el proteosoma 26S (Moon y col., 2004 ; Browse, 2009). En particular, la proteína COI1 reconoce las proteínas represoras con dominios ZIM de unión a jasmonato (JAZ) (Chini y col., 2007) e inicia su degradación, permitiendo así la expresión del factor de transcripción MYC2 que activa la síntesis de JA (Browse, 2009). Este factor de transcripción (y probablemente otros como recientemente se observó para MYC3 y MYC4 (Fernandez Calvo y col., 2011)) favorece también la expresión de los genes de respuesta a jasmónico desencadenando la respuesta fisiológica correspondiente (Sheard y col., 2010). El triple mutante *myc2/myc3/myc4* era fenotípicamente parecido al mutante *coil*, pero sin embargo no todos los mecanismos de respuesta al JA estaban bloqueados en él, de hecho este mutante seguía siendo resistente a determinados patógenos y herbívoros (Fernandez Calvo y col., 2011).

La oxilipina OPDA se relacionó con la respuesta de las plantas a la herida o al estrés osmótico (Kramell y col., 2000 ; Reymond y col., 2000 ; Stintzi y col., 2001 ; Taki y col., 2005). También se relacionó con la defensa frente a patógenos ya que se observó que el mutante *opr3* a pesar de su esterilidad, debida a su incapacidad de sintetizar JA, era resistente al díptero *Bradysia impatiens* y al hongo *Alternaria brassicicola* (Stintzi y col., 2001). En los trabajos de Stintzi y col., (2001) y Taki y col., (2005) el tratamiento de plantas del mutante *opr3* con OPDA exógeno provocó la inducción de genes a través de dos rutas diferentes, una dependiente y otra independiente de COI1. Otro trabajo adicional también vinculaba el ODPA a una ruta de señalización dependiente de COI1 (Ribot y col., 2008). Un trabajo más reciente con el mutante *opr3*, mostraba que en determinadas condiciones como la infección con hongos, el mutante es capaz de sintetizar jasmónico a través de la escisión del segundo intrón del gen que incluye el T-DNA de 17 kb (Chehab y col., 2011). Los datos proporcionados por Chehab y col., (2011) ponen de manifiesto las precauciones que deben tomarse en el uso de mutantes, en éste caso de inserción,

en los experimentos de suplementación, y aunque los datos del trabajo provocan la reasignación de algunos genes regulados por OPDA (ORGs) a regulados por JA (JRGs) no desmienten el papel de esta oxilipina en otros procesos.

4.3.6. *El papel del dnOPDA como fitohormona*

Sobre el posible papel del dnOPDA como fitohormona los conocimientos son escasos, pues hasta el momento no se han realizado experimentos con dnOPDA. Dada la elevada similitud estructural con el OPDA en los trabajos realizados con esta hormona se le presupone, al dnOPDA, una acción parecida (Stintzi y col., 2001). Es conocida la síntesis de jasmonato a partir de los ácidos grasos hexadecatrienoico (16:3) y linolénico (18:3), aunque la tasa de producción de jasmonato desde cada uno de ellos es desconocida, así como su velocidad de conversión. Por otro lado también es conocido que los niveles de dnOPDA se ven incrementados en respuesta a la herida, al igual que los de OPDA y JA (Weber y col., 1997). Sin embargo, desconocemos si el dnOPDA tiene actividad hormonal, la cual podría llevarse a cabo de un modo independiente o a través de la interacción (sinérgica o antagónica) con otras fitohormonas. En el caso de que el dnOPDA tuviera actividad hormonal, se desconoce el grupo de genes sobre los que produce una respuesta. Algunas de estas cuestiones son a las que se pretende dar respuesta en este capítulo de esta Tesis Doctoral.

4.3.7. Mutantes de desaturasas de *Arabidopsis* y jasmonatos

En una Tesis Doctoral anterior del grupo se trabajó con los mutantes *fad5* (Kunst y col., 1989a) y *fad3/fad7/fad8* (McConn y Browse, 1996), cuyo objetivo inicial era analizar posibles genes controlados a nivel transcripcional relacionados con el transporte de lípidos entre membranas. El transporte de lípidos regula la síntesis global de éstos de manera coordinada entre los dos orgánulos. Sin embargo, los perfiles transcriptómicos, revelaron que la mayoría de los genes con expresión diferencial en ambos mutantes estaban relacionados con el estrés en general y más en particular con el estrés biótico. Dado que el ácido graso linolénico (18:3) y el ácido graso hexadecenoico (16:3) son precursores de la síntesis de oxilipinas, el análisis se reinterpretó bajo esta perspectiva.

En la tabla 4.1 se indica la composición de ácidos grasos por clase de lípido de los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8*.

A. graso	MGDG		DGDG		SL		PG		PC		PE		PI	
	WT	<i>fad5</i>	WT	<i>fad5</i>	WT	<i>fad5</i>	WT	<i>fad5</i>	WT	<i>fad5</i>	WT	<i>fad5</i>	WT	<i>fad5</i>
16:0	2	13.8	13.6	26	38.5	39.3	28	30.8	24.4	30.2	30	31.9	43.5	44.1
16:1 c+t	0.5	0.1	-	-	-	-	21.1	19.5	-	-	-	-	-	-
16:2	1.8	0.1	0.4	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16:3	30.9	-	2.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18:0	0.1	0.6	1	2.5	2.4	2.4	1	2	2.1	2.4	2.2	2.1	3	5.6
18:1	0.6	1	1.5	0.9	2.8	3.1	4.8	5.1	5.3	5.5	3.3	3.5	3.6	4.4
18:2	3.7	3.1	5.7	2	14.7	10.4	10.9	10.8	32.4	30.2	34.4	33.5	22.5	19.8
18:3	60	80.7	75.1	67.9	41.3	44.7	33.9	30	35	31.6	29.8	26.1	27.1	25
% de lípidos polares	38.9	38.3	16.1	13.7	4	3.3	10	11.7	16.6	17.7	11.2	12.3	3.9	3.4
Ácido graso	MGDG		DGDG		SL		PG		PC		PE		PI	
	WT	TM	WT	TM	WT	TM	WT	TM	WT	TM	WT	TM	WT	TM
16:0	1.8	1.4	12.1	7.6	34.4	30.8	27.2	26.4	20.7	17.9	29	25.8	44.4	40.4
16:1 c+t	1.4	2.7	0.4	0.5	0.3	1	16.1	18.1	-	-	-	-	-	-
16:2	1.7	27.6	0.9	3.5	-	2.1	-	1.2	-	-	-	-	-	-
16:3	30.6	-	2.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18:0	0.2	0.2	1.09	0.5	2.9	1.8	1.1	0.9	2	1.1	2.1	1.3	2.9	2.6
18:1	1	3.4	0.8	1.5	2.9	5.5	4.6	10.3	5.5	11.2	2.3	5.6	1.6	3.8
18:2	3.2	64.6	4.8	85.9	16.3	57.3	10.4	42.7	36.5	67.7	38.5	65.4	24.5	49.1
18:3	60	0.1	77.2	0.1	41.6	0.1	39.8	-	34.7	0.1	27.2	0.1	24.3	0.1
% de lípidos polares	38.7	32.5	13.4	15.8	3.5	3.9	11.3	11.3	18.9	19.7	10.9	12.2	3.3	4.6

Tabla 4.1 Composición de ácidos grasos por clase de lípido de los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8* ó Triple Mutante (TM) extraídas de los trabajos de (Kunst y col., 1989b) y (McConn y Browse, 1996), respectivamente. Los datos mostrados en la tabla están representados en % molar. Todos los datos son de plantas crecidas a 22 °C.

Como se observa en la tabla 4.1, el mutante *fad5* se caracteriza por presentar una acumulación de ácido palmítico (16:0) en todos los glicerolípidos celulares y un descenso de los niveles de ácidos grasos poliinsaturados de 16 carbonos (16:1, 16:2 y 16:3) en los glicerolípidos cloroplásticos. En el caso del ácido graso hexadecenoico (16:3), los niveles no son detectables (Kunst y col., 1989b). Estos cambios son consecuencia directa del bloqueo en la desaturación de los lípidos producidos por la ruta procariota. En este mutante el nivel de 18:3 aumenta en el glicerolípidos cloroplástico MGDG, y se ve ligeramente reducido en DGDG. Los niveles de 16:1c+t del mutante *fad5* indicados en la tabla se corresponden a la totalidad de 16:1-cis

(16:1c) y 16:1-trans (16:1t), el nivel de 16:1c+t detectado para este mutante se correspondería al 16:1t sintetizado por FAD4.

Los niveles de ácidos grasos del mutante *fad3/fad7/fad8* revelan una acumulación de ácidos grasos diinsaturados (16:2 y 18:2) y un enorme descenso de los ácidos grasos triinsaturados (16:3 y 18:3), que en el caso del 16:3 también son indetectables (McConn y Browse, 1996). Estos datos son coherentes con la ausencia de actividad ω -3 desaturasa en este mutante. Ambos cambios se observan en todos los glicerolípidos celulares y son consecuencia directa de la eliminación de toda la actividad ω -3 desaturasa en este mutante.

4.3.8. Análisis de los genes con expresión diferencial

Los datos presentados en este apartado fueron obtenidos anteriormente en nuestro grupo y reanalizados en esta Tesis Doctoral. En la figura 4.3 se muestra un diagrama de Venn con los genes que mostraron expresión diferencial en cada mutante tras el análisis.

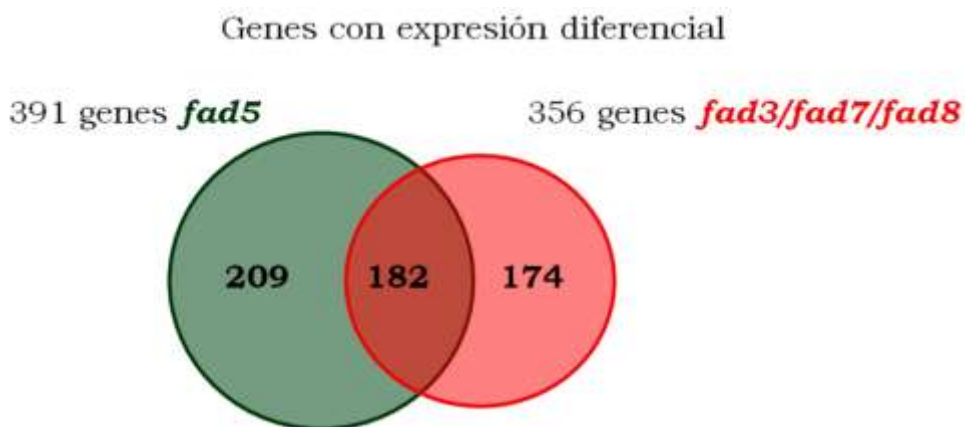


Figura 4.3 Diagramas de Venn que muestran los genes expresados diferencialmente en cada mutante. El número indicado sobre el fondo verde indica los genes expresados diferencialmente de manera exclusiva en el mutante *fad5*. El número indicado sobre el fondo rojo indica los genes expresados diferencialmente de manera exclusiva en el mutante

fad3/fad7/fad8. El número indicado en la superposición de ambos círculos indica el número de genes comunes a ambos mutantes.

Como se observa en la figura 4.3, fueron 391 y 356 genes los que se expresaron de manera diferencial en los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8*, respectivamente. De todos estos genes, 182 eran comúnmente expresados de manera diferencial en ambos mutantes.

El análisis de los genes inducidos se muestra en la figura 4.4.

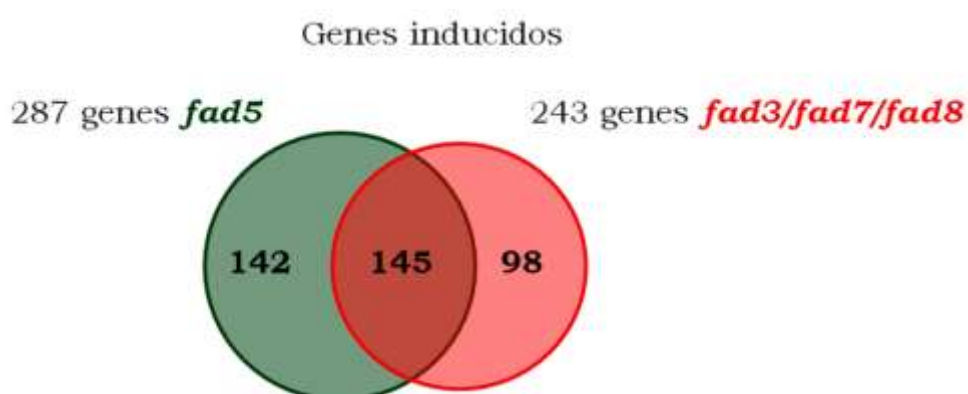


Figura 4.4 Diagramas de Venn que muestran los genes inducidos en cada mutante. El número indicado sobre el fondo verde indica los genes inducidos de manera exclusiva en el mutante *fad5*. El número indicado sobre el fondo rojo indica los genes inducidos de manera exclusiva en el mutante *fad3/fad7/fad8*. El número indicado en la superposición de ambos círculos indica el número de genes comunes a ambos mutantes.

Como se observa en la figura 4.4, fueron 287 y 243 genes inducidos en los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8*, respectivamente. De todos estos genes, 145 eran comunes a ambos mutantes.

El análisis de los genes reprimidos se muestra en la figura 4.5.

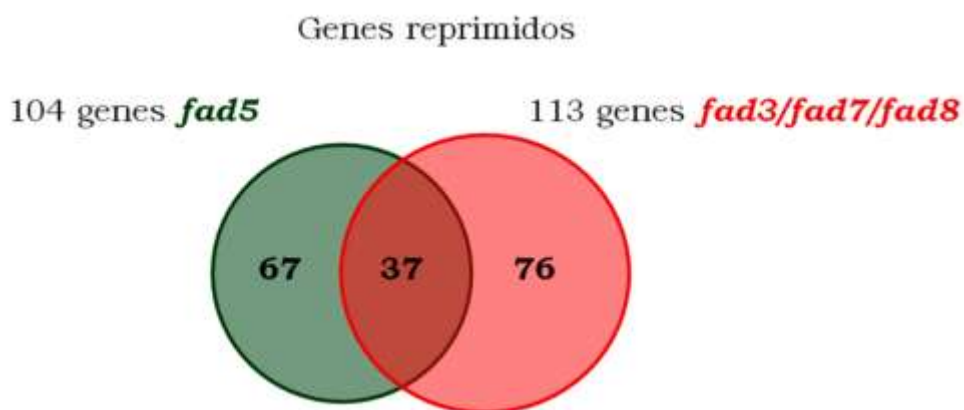


Figura 4.5 Diagramas de Venn que muestran los genes reprimidos en cada mutante. El número indicado sobre el fondo verde indica los genes reprimidos de manera exclusiva en el mutante *fad5*. El número indicado sobre el fondo rojo indica los genes reprimidos de manera exclusiva en el mutante *fad3/fad7/fad8*. El número indicado en la superposición de ambos círculos indica el número de genes comunes a ambos mutantes.

Como se observa en la figura 4.5, fueron 104 y 113 genes reprimidos en los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8*, respectivamente. De todos estos genes, 37 eran comunes a ambos mutantes.

4.3.9. Clasificación de los genes con expresión diferencial

Los genes con expresión diferencial en ambos mutantes fueron agrupados en diferentes categorías funcionales mediante el uso de la clasificación por ontología génica (GO) de la base de datos de Arabidopsis (<http://www.arabidopsis.org>). La distribución global estos genes en las diferentes categorías funcionales se muestra en la figura 4.6.

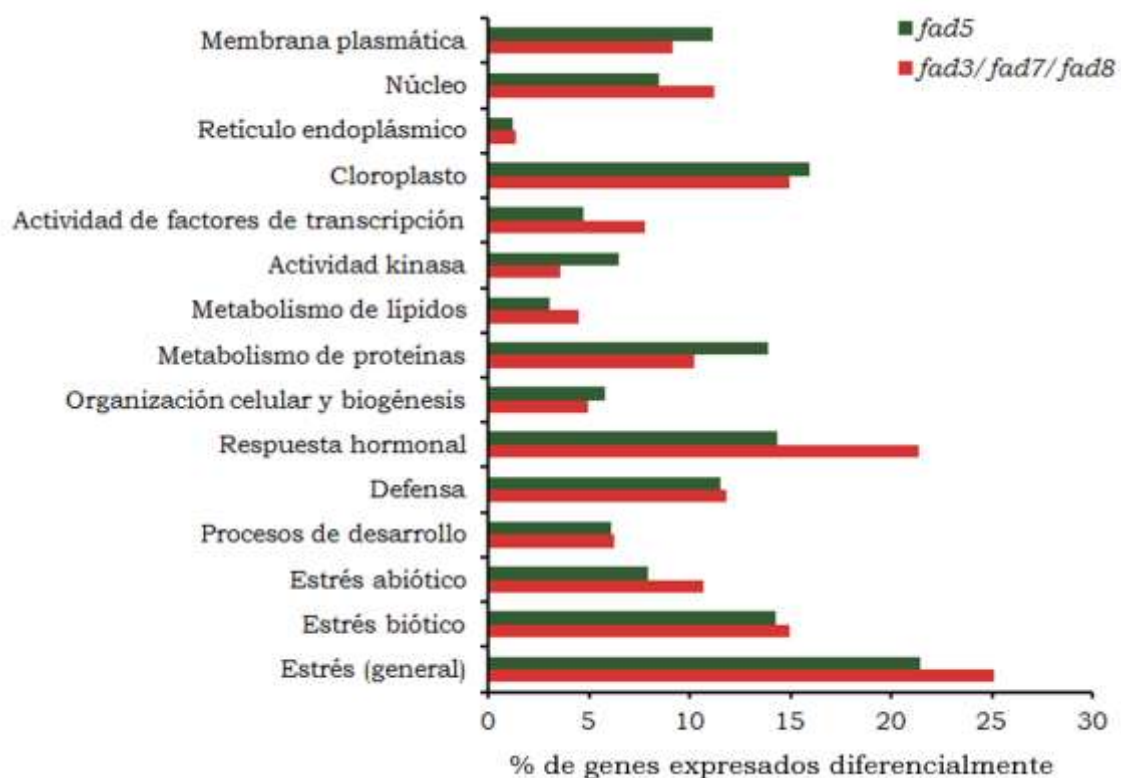


Figura 4.6 Distribución de los genes con expresión diferencial en cada mutante en las diferentes categorías funcionales según la base de datos www.arabidopsis.org. Las barras de color verde representan el porcentaje de genes agrupados en las categorías funcionales en el caso del mutante *fad5*. Las barras de color rojo representan el porcentaje de genes agrupados en las categorías funcionales en el caso del mutante *fad3/fad7/fad8*.

Como se observa en la figura 4.6, existe un gran porcentaje de genes expresados de manera diferencial en ambos mutantes relacionados con el estrés general (22 % en el mutante *fad5* y 25 % en el mutante *fad3/fad7/fad8*) y el estrés biótico (alrededor de un 15 % en ambos mutantes). Estos elevados porcentajes de genes se relacionaron con los genes implicados con la defensa (aproximadamente 12 % en ambos mutantes) y la respuesta hormonal (15 % en el mutante *fad5* y 22 % en el mutante *fad3/fad7/fad8*). Estos resultados podrían ser esperables en el caso del mutante *fad3/fad7/fad8*, pues al carecer de ácidos grasos 16:3 y 18:3 es incapaz de sintetizar todas las oxilipinas y presenta una mayor sensibilidad al

estrés biótico y también al ataque por patógenos (McConn y col., 1997). La ausencia de ácidos grasos poliinsaturados en este mutante también suponía la causa de su esterilidad masculina, sin embargo la suplementación con Na18:3 restauraba la fertilidad (McConn y Browse, 1996). Estos experimentos supusieron la prueba empírica de que el ácido linolénico (18:3) es esencial para el desarrollo del polen, y no para la fotosíntesis como se había pensado hasta entonces (McConn y Browse, 1996). Sin embargo, en el caso del mutante *fad5* este resultado es sorprendente, dado que este mutante posee niveles de 18:3 similares a los de la línea silvestre y por tanto posee tanto los sustratos como las enzimas necesarias para sintetizar JA, a excepción de los producidos a través de la vía del 16:3.

En la figura 4.7 se muestra un análisis más detallado de los genes implicados en la respuesta hormonal, subclasificados por tipo de hormona.

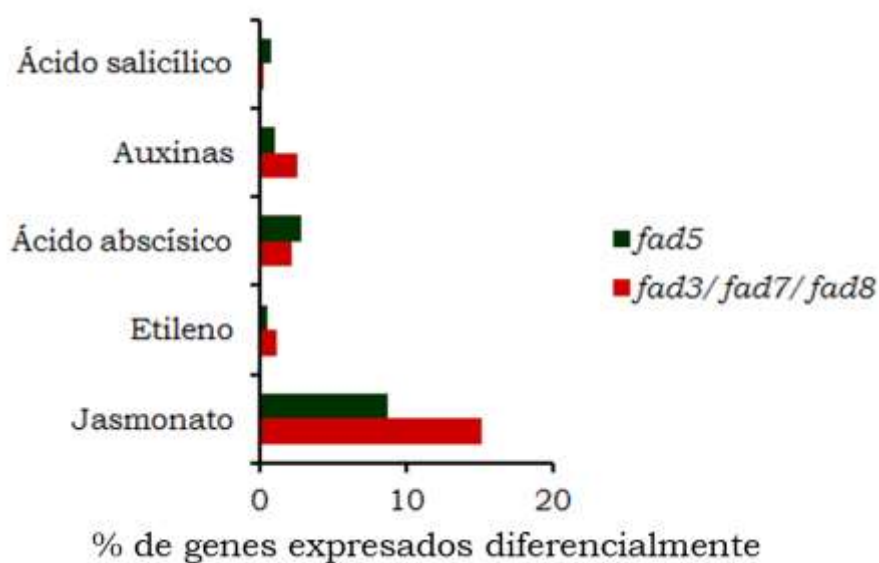


Figura 4.7 Distribución de los genes con expresión diferencial relacionados con la respuesta hormonal. Las barras de color verde representan el porcentaje de genes agrupados en las categorías funcionales en el caso del mutante *fad5*. Las barras de color rojo representan el porcentaje de genes agrupados en las categorías funcionales en el caso del mutante *fad3/fad7/fad8*.

Los datos de clasificación de los genes con expresión diferencial con relación a la respuesta hormonal de la figura 4.7 muestran que los pertenecientes al grupo de los jasmonatos son los mayoritarios (9 % en el mutante *fad5* y 15 % en el mutante *fad3/fad7/fad8*).

Estas alteraciones son consistentes con el patrón de crecimiento de la raíz en ambos mutantes, pues el JA es un conocido regulador negativo de la longitud de la raíz que también controla el número de raíces secundarias (Staswick y col., 1992). De hecho, el patrón de longitud de raíz es utilizado como uno de los signos más claros de alteración en los niveles de JA. La figura 4.8 muestra los datos obtenidos en el análisis de la longitud de la raíz de ambos mutantes, comparados con la línea silvestre en condiciones normales de crecimiento y bajo suplementación con JA.

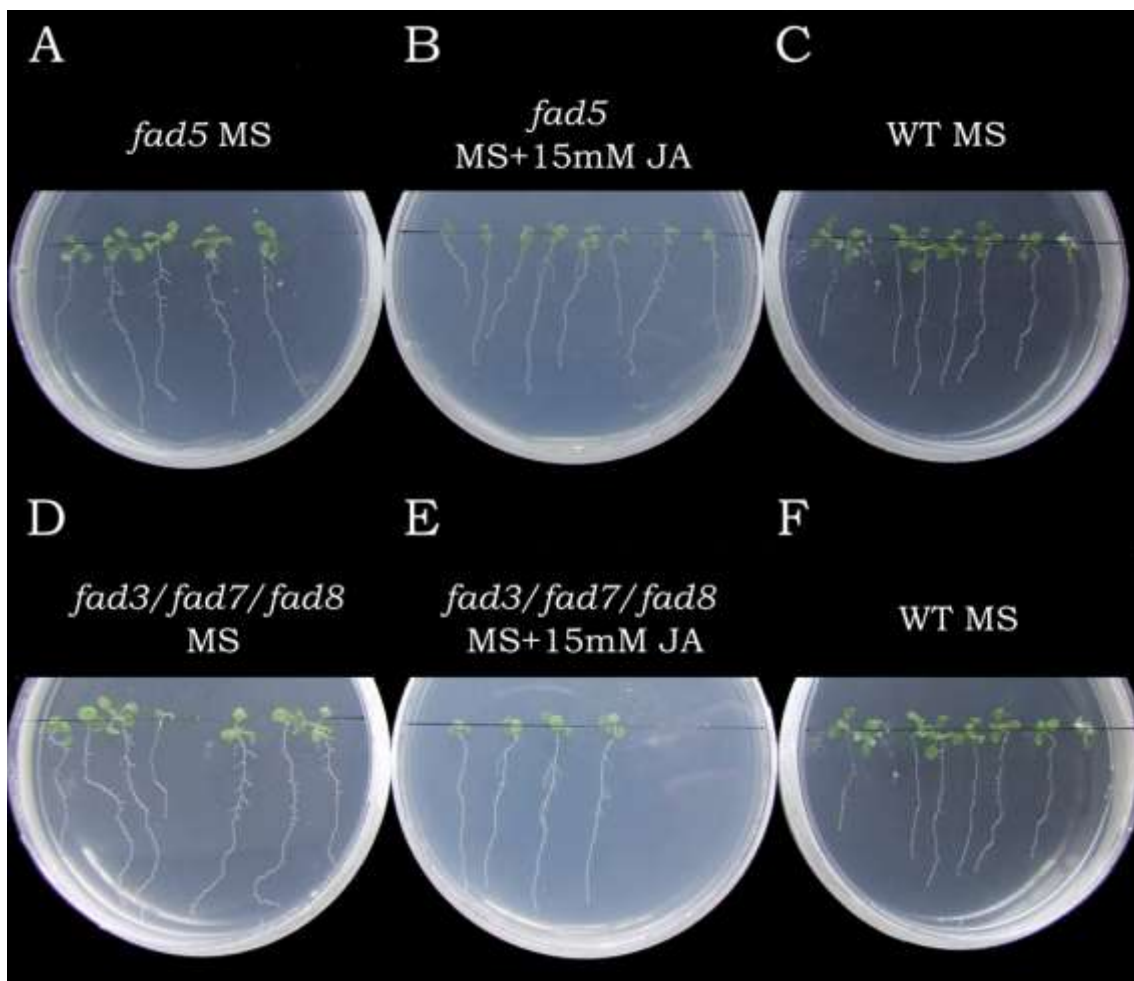


Figura 4.8 Imágenes de la longitud de raíz en los mutantes fad5 y fad3/fad7/fad8 en condiciones normales y bajo suplementación con jasmónico 15 μ M en comparación con la línea silvestre. (A) Mutante fad5 en condiciones control. (B) Mutante fad5 suplementado con JA 15 μ M. (C y F) Línea silvestre en condiciones control. (D) Mutante fad3/fad7/fad8 en condiciones control. (E) Mutante fad3/fad7/fad8 suplementado con JA 15 μ M.

Como se observa en la figura 4.8, el mutante *fad3/fad7/fad8* presenta una raíz más larga y con más raíces secundarias que la línea silvestre, lo cual es consistente con la ausencia de JA. Estos efectos parecen revertirse, al menos parcialmente, con la suplementación con JA en este mutante, la raíz se acorta y disminuye el número y el tamaño de las raíces secundarias. Más interesantes aún son los resultados obtenidos con el mutante *fad5*, que mostraba también una raíz más larga y un mayor número de raíces secundarias que la línea silvestre. Estos efectos también se veían revertidos en este mutante tras la adición de JA en el medio de cultivo. Esta observación sugiere que la ausencia de ácido graso hexadecatrienoico (16:3) en este mutante está afectando a la biosíntesis de oxilipinas relacionadas con el control del desarrollo de este tejido.

4.3.10. Genes regulados por jasmonatos

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos anteriormente, decidimos analizar nuestros datos de transcriptómica comparándolos con los datos publicados por Taki y col., (2005) en los que identificaban los genes regulados por JA (JRGs, de Jasmonate Regulated Genes) y OPDA (ORGs, de OPDA Regulated Genes) tras la suplementación con las dos hormonas en plantas de la línea silvestre de *Arabidopsis*. Este análisis consistió en el estudio de la distribución de los denominados JRGs y ORGs identificados por Taki y col., (2005), dentro de los genes

con expresión diferencial de nuestro análisis transcriptómico. Los resultados se muestran en la figura 4.9.

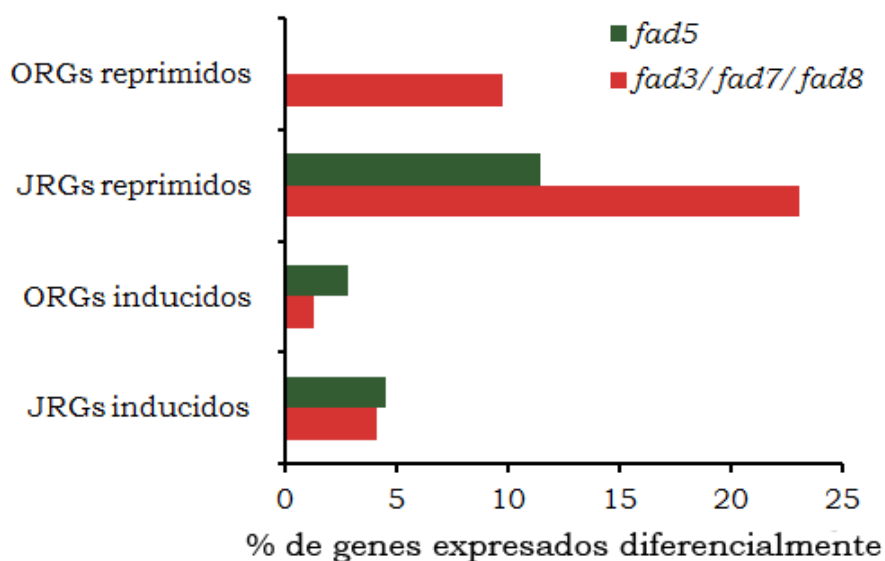


Figura 4.9 Distribución de los genes identificados como regulados por jasmonico (JRGs) o por OPDA (ORGs) en el mutante *fad5* (en verde) y *fad3/fad7/fad8* (en rojo).

Una primera conclusión de este análisis es que un gran número de genes (hasta 50 de 356) habían sido identificados por Taki y col., (2005) como JRGs u ORGs en el mutante *fad3/fad7/fad8*. Entre estos genes se encuentran marcadores típicos de biosíntesis o respuesta a JA como las proteínas de defensa *PDF1.2a* y *PDF1.2b*, el gen *LOX2* o el regulador transcripcional *MYC2*. Lo más interesante de los resultados es que la mayoría de estos genes se encontraban localizados entre los genes reprimidos en el mutante *fad3/fad7/fad8*, lo cual es consistente con la ausencia de JA en este mutante. En el caso del mutante *fad5*, aunque el número de genes era menor, de nuevo encontramos que la mayoría de JRGs y ORGs se localizan también entre los genes reprimidos. Este resultado reforzó la hipótesis de que la ausencia de 16:3 y de dnOPDA tenía un efecto a nivel transcriptómico en este mutante.

4.3.11. Niveles de jasmonatos en respuesta a herida

Como los ácidos grasos poliinsaturados son precursores de la síntesis de oxilipinas, los niveles de estas hormonas en estos mutantes están alterados, tal y como muestra la tabla 4.2 para el caso del mutante *fad5*.

Compuesto	Línea silvestre		Mutante <i>fad5</i>	
	Control	Herida (90min)	Control	Herida (90min)
dnOPDA	18.81 ± 8.50	86.98 ± 17.37	0	0
OPDA	343.41 ± 65.98	820.84 ± 203.95	23.12 ± 6.04	836.3 ± 231.5
JA	36.65 ± 5.72	1426 ± 228.1	25.52 ± 1.94	1022 ± 72.76

Tabla 4.2 Cantidades detectadas en plantas de la línea silvestre y del mutante fad5 de las oxilipinas dnOPDA, OPDA y JA, tanto en condiciones control como tras el experimento de herida. Extraída y adaptada de (Weber y col., 1997).

En la tabla 4.2 se observa que las tres oxilipinas (dnOPDA, OPDA y JA) aumentaron sus niveles después de la herida en plantas de la línea silvestre. Sin embargo, como el mutante *fad5* no posee cantidades detectables de ácido graso 16:3 (Kunst y col., 1989a), tampoco posee la oxilipina dnOPDA, lo cual fue comprobado en posteriores trabajos (Weber y col., 1997). Como se observa en la tabla 4.2, los niveles de esta oxilipina tampoco incrementaron durante los experimentos de herida realizados sobre este mutante (Weber y col., 1997). Con respecto al OPDA en el mutante *fad5*, los niveles basales parecen ser mucho más bajos que en la línea silvestre, sin embargo esto no afecta a su incremento en la producción tras la herida. El nivel de JA en este mutante parece ser sólo algo menor en condiciones de reposo, y significativamente menor en condiciones de herida en comparación con la línea silvestre. Estos resultados sugieren que la

ausencia de dnOPDA en este mutante podría estar afectando a la proporción individual de OPDA y JA tanto en condiciones de reposo como tras la herida.

Con respecto a la distribución de JRGs y ORGs en el mutante *fad5* (figura 4.9), es comprensible la ausencia de ORGs reprimidos además de que el número de ORGs inducidos es muy bajo dado que en este mutante los niveles de 18:3 son similares a los de la línea silvestre (Kunst y col., 1989b). Sin embargo, es a su vez cierto, que los niveles de OPDA en el mutante *fad5* (23.12 ± 6.04) parecen ser mucho más bajos que los de la línea silvestre (343.41 ± 65.98) (Weber y col., 1997), lo cual hace muy significativo que no se encuentren grandes cambios en cuanto a la expresión de los ORGs en este mutante. El análisis de la distribución de los JRGs en el mutante *fad5* revela datos curiosos. El solo hecho de encontrar JRGs reprimidos en este mutante podría estar implicando que la regulación génica por JA no depende únicamente del 18:3 y el OPDA. Esto indicaría que la ausencia de 16:3 y dnOPDA en ambos mutantes también afecta a la síntesis total de jasmónico ya que los niveles de esta hormona son ligeramente menores en el mutante *fad5* (25.52 ± 1.94) que en la línea silvestre (36.65 ± 5.72). Y que el nivel total de jasmónico y/o el origen del mismo, (dnOPDA u OPDA) influyen en la posterior regulación génica.

4.3.12. Análisis de los genes comunes

El análisis de los 182 genes comunes según su patrón de expresión mediante agrupación jerárquica, mostró que estos genes poseían un comportamiento similar en ambos mutantes. La figura 4.10 muestra la agrupación generada con el programa Multiple Array Viewer.

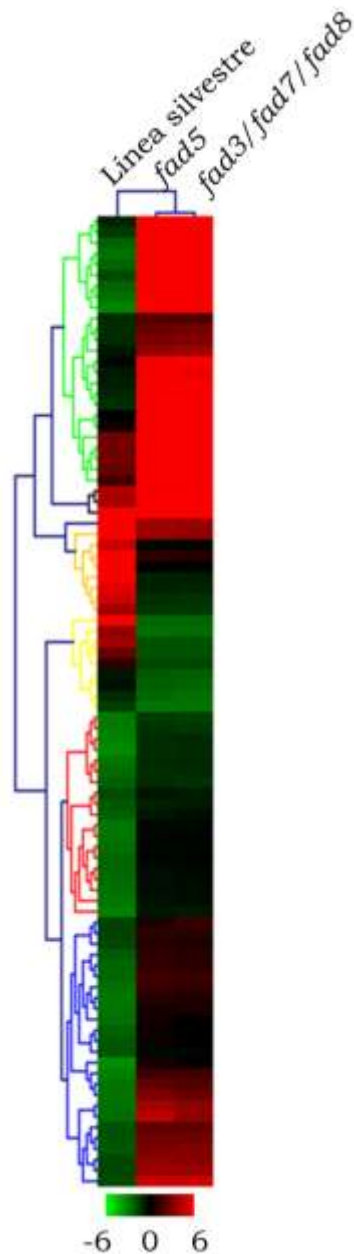


Figura 4.10 Genes comunes expresados diferencialmente en ambos mutantes agrupados según su patrón de expresión. Los genes se muestran en tres columnas, la correspondiente a la línea silvestre (izquierda), la correspondiente al mutante fad5 (centro) y la correspondiente al mutante fad3/fad7/fad8 (derecha). Los colores indican los niveles de expresión, en verde los niveles más bajos y en rojo los más altos.

Como se observa en la figura 4.10, los genes comunes en los mutantes, tanto los que se inducen (más rojos que los de la línea silvestre) como los que se reprimen

(más verdes que los de la línea silvestre), se comportan de manera similar en ambos mutantes. Estos mismos genes comunes fueron agrupados en diferentes categorías funcionales mediante la utilización de la clasificación por ontología génica (GO) descrita en el apartado anterior. Esta clasificación se muestra en la figura 4.11.

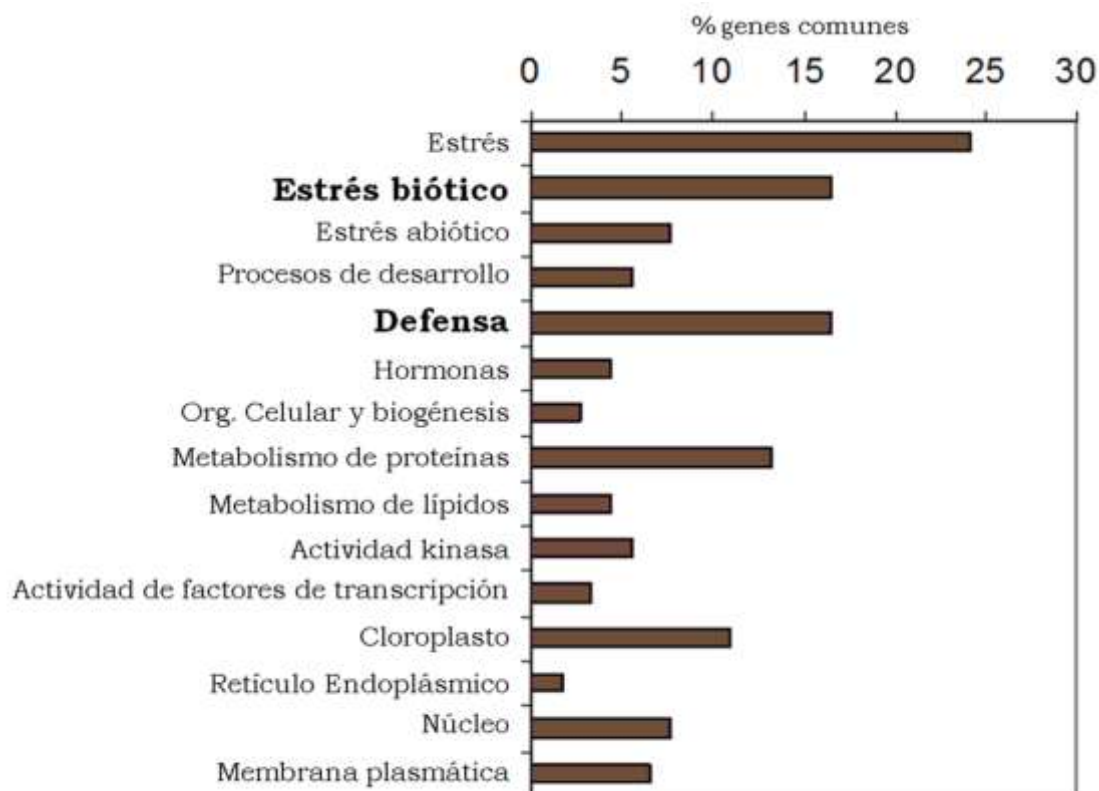


Figura 4.11 Distribución de los genes comunes a ambos mutantes en las diferentes categorías funcionales según la base de datos www.arabidopsis.org.

Como se observa en la figura 4.11, los genes comunes a ambos mutantes también se agrupan principalmente en las categorías de estrés, fundamentalmente estrés biótico y defensa.

Todos los datos anteriormente expuestos nos llevaron a plantear una hipótesis de trabajo en la que los posibles genes regulados (transcripcionalmente) por dnOPDA (dnORGs) estarían localizados entre los genes comunes a ambos mutantes

y también entre los genes con expresión diferencial exclusivos del mutante *fad5*. Evidentemente, esta hipótesis es sencilla y no contempla la posible y probable interacción entre oxilipinas y/u otras hormonas (etileno, ácidos salicílico,...). La hipótesis se resume en la figura 4.13.

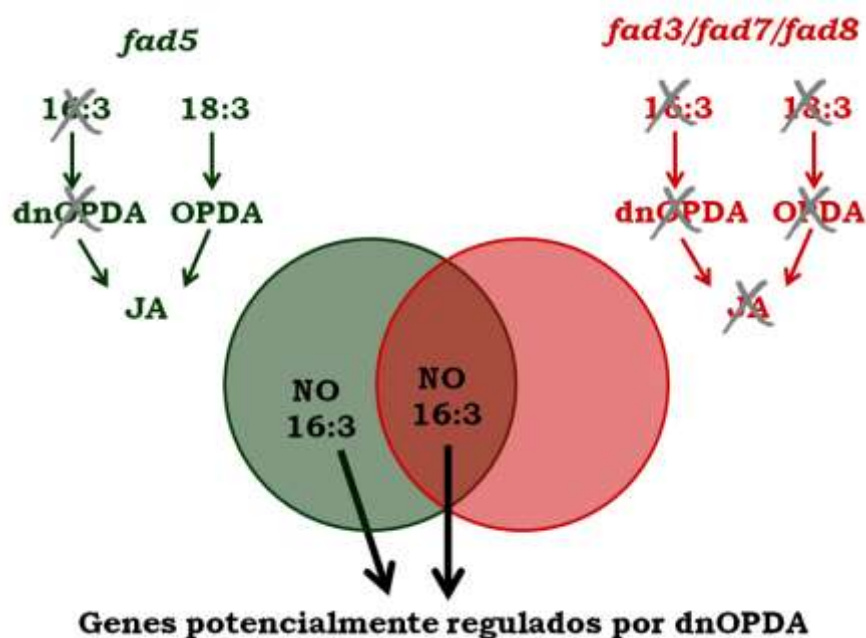


Figura 4.13 Hipótesis de trabajo planteada en esta Tesis Doctoral en la que los genes potencialmente regulados por dnOPDA se encontrarían entre los genes exclusivos del mutante *fad5* y los genes comunes.

Dada la posibilidad de que entre los genes comunes se encontraran algunos genes regulados por dnODPA (dnORGs), el perfil de distribución de los JGRs, ORGs y genes comunes en el mutante *fad3/fad7/fad8* podría darnos alguna pista sobre el comportamiento de estos genes. Así, se analizó el agrupamiento (según su patrón de expresión) de los genes expresados diferencialmente en el mutante *fad3/fad7/fad8* comparado con la línea silvestre, utilizando el programa Multi Array Viewer. Esto permitió analizar la distribución de los genes regulados por OPDA (ORGs), por JA (JRGs) y los genes comunes en los diferentes grupos generados. Este agrupamiento se observa en la figura 4.12.

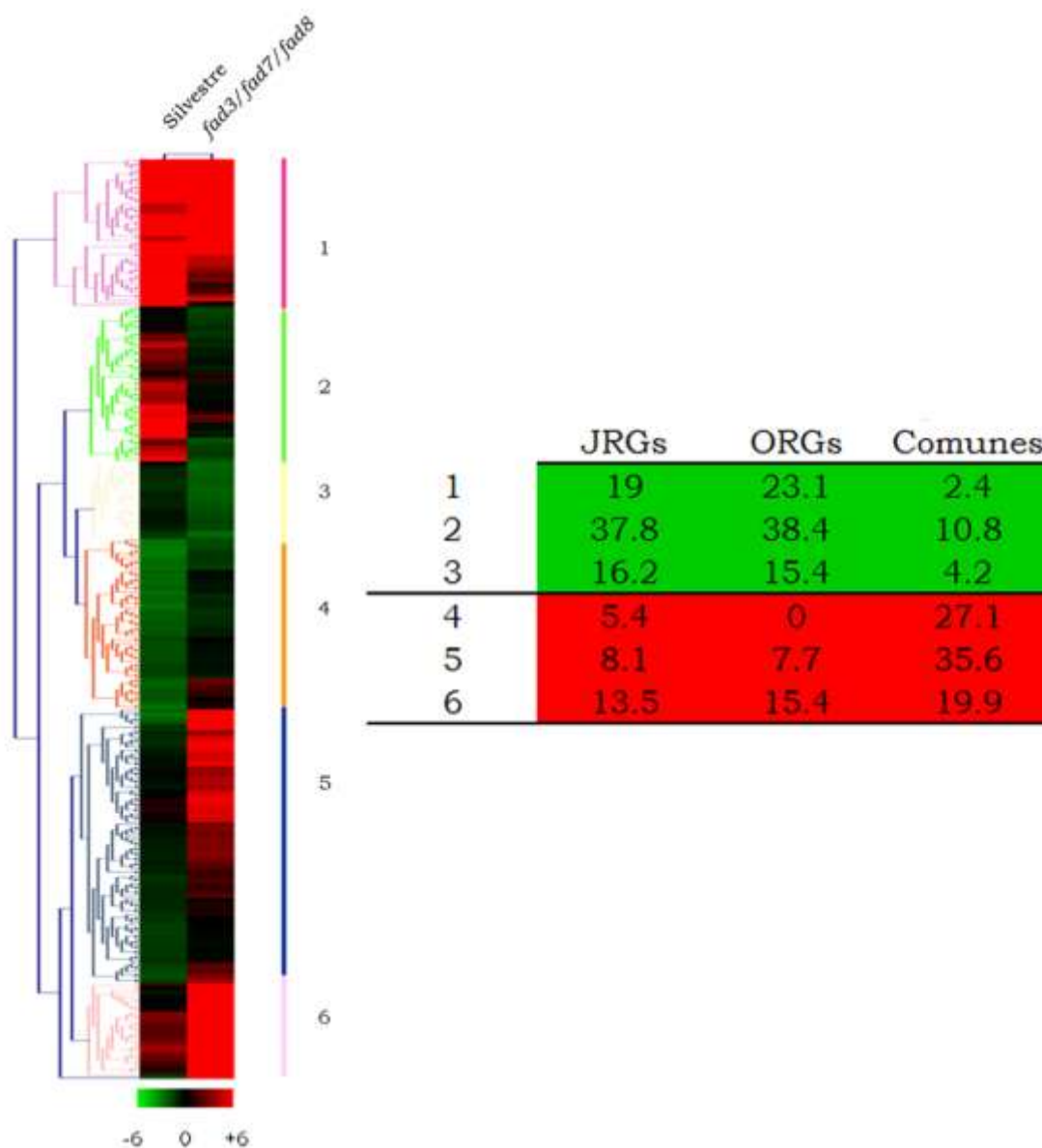


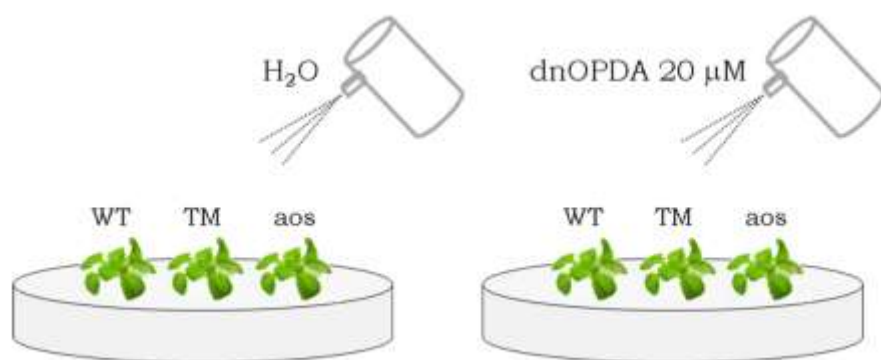
Figura 4.12 Genes expresados diferencialmente en el mutante *fad3/fad7/fad8* agrupados según su patrón de expresión. Los genes se muestran en dos columnas, la correspondiente a la línea silvestre (izquierda) y la correspondiente al mutante *fad3/fad7/fad8* (derecha). Los colores indican los niveles de expresión, en verde los niveles más bajos y en rojo los más altos. La tabla de la derecha indica la distribución en porcentaje de genes regulados por JA (JRGs), por OPDA (ORGs) y genes comunes en los diferentes grupos generados.

Como se observa en la figura 4.12, el agrupamiento según el patrón de expresión de los genes del triple mutante en comparación con la línea silvestre genera 6 grupos diferentes. La localización de los JRGs, ORGs y genes comunes en cada uno de estos grupos se expresa (en porcentajes) en la tabla adjunta en la figura. Los JRGs y ORGs se acumulan principalmente en los grupos 2 y 6. La proporción de genes comunes reprimidos se encuentra en el grupo 2, del mismo modo que los JRGs y ORGs que se comportan así. Uno de los datos más relevantes de la figura 4.12 es que la mayoría de los genes comunes inducidos se localiza en grupos diferentes a los ORGs y JRGs, sugiriendo que estos genes podrían desarrollar una función independiente del OPDA y el JA.

4.3.13. Experimentos de suplementación con dnOPDA

Una de las maneras de poder demostrar la existencia de genes regulados por dnOPDA era realizar ensayos de suplementación con esta hormona y analizar la expresión de determinados genes diana elegidos a partir de los datos transcriptómicos. Esta aproximación plantea varios problemas, siendo el más importante la escasa y costosa disponibilidad de dnOPDA. Debido a que se han realizado muy pocos estudios relacionados con el dnOPDA y que ésta es una molécula de la que no se trata mucho en los estudios sobre oxilipinas, las posibilidades de obtener dnOPDA purificado eran escasas y probablemente muy caras. En primer lugar se adquirió comercialmente una ampolla de dnOPDA (LARODAN, SUECIA (<http://www.larodan.se/index.php>)). Con esta ampolla se realizó un primer ensayo de suplementación con dnOPDA sobre plantas de línea silvestre y del mutante *fad3/fad7/fad8*. Este primer ensayo se realizó sobre estas dos líneas ya que la silvestre poseía las tres oxilipinas principales (dnOPDA, OPDA y JA) y el mutante *fad3/fad7/fad8* ninguna de ellas. De este modo, en el mutante *fad3/fad7/fad8* podríamos evaluar el efecto directo del dnOPDA y en la línea

silvestre detectar las diferencias en la respuesta, relacionadas con la interacción con otros jasmonatos. Este ensayo se realizó sobre plantas que se germinaron y crecieron en placas de MS durante 14 días y el día del experimento se colocaron en medio MS líquido conteniendo 20 μM de dnOPDA, de tal manera que la absorción de la oxilipina se produciría por la raíz. Este primer ensayo planteó en primer lugar, el problema de la propia absorción del dnOPDA y, en segundo lugar, la posible existencia de cambios transcripcionales de determinados genes producidos por el paso de la placa al tubo y no por la adición de la hormona. A continuación, se planteó un segundo ensayo menos invasivo. Un esquema representativo del planteamiento del este ensayo se encuentra en la figura 4.14.



*Figura 4.14 Esquema visual del segundo experimento de suplementación con dnOPDA llevado a cabo durante esta Tesis Doctoral. Las plantas de la línea silvestre y de los mutantes *fad3/fad7/fad8* y *aos* se germinaron y crecieron en placas de MS durante 14 días y el día 14 se realizó la suplementación mediante la utilización de un aerosol.*

Como se observa en la figura 4.14, este segundo ensayo consistiría en la aplicación mediante un aerosol de la solución con dnOPDA. Las plantas control se tratarían del mismo modo con agua purificada, que fue el solvente utilizado para la disolución del dnOPDA. Este experimento se realizó tanto con plantas de la línea silvestre, como con los mutantes *fad3/fad7/fad8* y *aos* (Aleno Óxido Sintasa).

Ambos mutantes tienen en común que no pueden sintetizar JA. Sin embargo el mutante *aos* no posee ninguna alteración en los ácidos grasos o lípidos de membrana y, por tanto, nos permitió descartar posibles efectos inespecíficos debidos a la ausencia de ácidos grasos poliinsaturados en las membranas del mutante *fad3/fad7/fad8*. En este segundo experimento, el dnOPDA fue proporcionado por el Dr. Mats Hamberg (Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia). Las muestras se tomaron en el tiempo de inicio (tiempo 0), y a los 30, 90 y 180 minutos de tratamiento.

Siguiendo con la hipótesis de trabajo, se elaboraron listas con los genes específicos del mutante *fad5* y los genes comunes y se eligió un número concreto de éstos para analizar su respuesta a la suplementación con dnOPDA. Los genes que se analizaron por PCR semicuantitativa se muestran en la tabla 4.3.

ID	Nombre	Tm PCR	t extensión (s)	n° ciclos	Amplicón (pb)
At3g18780	<i>ACT2</i>	59	30	27	494
At1g68840	<i>RAV2</i>	58	30	38	283
At2g39330	<i>JAL23</i>	58	30	30	490
At1g32640	<i>MYC2</i>	52	30	30	280
At3g45140	<i>LOX2</i>	56	60	30	982
At1g17420	<i>LOX3</i>	52	30	32	240
At4g15440	<i>HPL1</i>	52	30	38	150
At2g06050	<i>OPR3</i>	57	60	30	809
At3g16450	<i>JAL33</i>	52	30	35	435
At1g66100	-	52	30	38	289
At4g19500	-	52	30	38	281
At4g02540	-	52	30	38	272
At1g27540	-	52	30	35	401
At1g09420	<i>G6PD4</i>	52	30	31	229
At1g54040	<i>ESP/ESR</i>	52	30	38	403
At2g03710	<i>AGL3/SEP4</i>	56	40	30	544
At5g38020	-	57	30	32	467
At5g41700	<i>UBC8</i>	53	30	32	166
At2g34930	-	58	30	30	455
At3g50970	<i>LTI30/XERO2</i>	59	30	30	430
At1g63090	<i>PP2-A11</i>	56	60	30	779
At3g09270	<i>GSTU8</i>	58	30	35	261/407
At1g27730	<i>ZAT10</i>	58	30	35	351
At1g43170	<i>ARP1/RP1/RPLA3</i>	56	15	35	100
At3g28270	-	51	30	35	487
At1g59590	<i>ZCF37</i>	51	30	35	483
At4g16880	-	51	15	35	262
At4g15910	<i>DI21</i>	53	15	35	286
At3g49120	<i>PERX34/PERXCB</i>	51	15	35	245
At1g01670	-	53	15	35	256
At1g66920	-	51	15	35	306 / 330
At2g14160	-	53	15	35	270
At2g22500	<i>UCP5</i>	53	15	35	213
At4g19510	-	53	30	35	511
At3g29670	<i>PMAT2</i>	53	30	35	422
At1g17640	-	53	30	35	453
At1g19180	<i>JAZ1</i>	51	15	35	297
At5g26920	<i>CBP60G</i>	51	15	35	245
At5g24780	<i>VSP1</i>	53	30	35	311
At3g56400	<i>WRKY70</i>	51	60	35	813
At5g02760	-	53	30	40	423
At2g46370	<i>JAR1</i>	53	30	40	632

Tabla 4.3 Genes amplificados por PCR semicuantitativa y condiciones de amplificación utilizadas en el segundo experimento de suplementación con dnOPDA.

Como se muestra en la tabla 4.3, se analizaron 43 genes por PCR semicuantitativa. De los genes analizados, los que respondían claramente al dnOPDA se muestran en la figura 4.15.

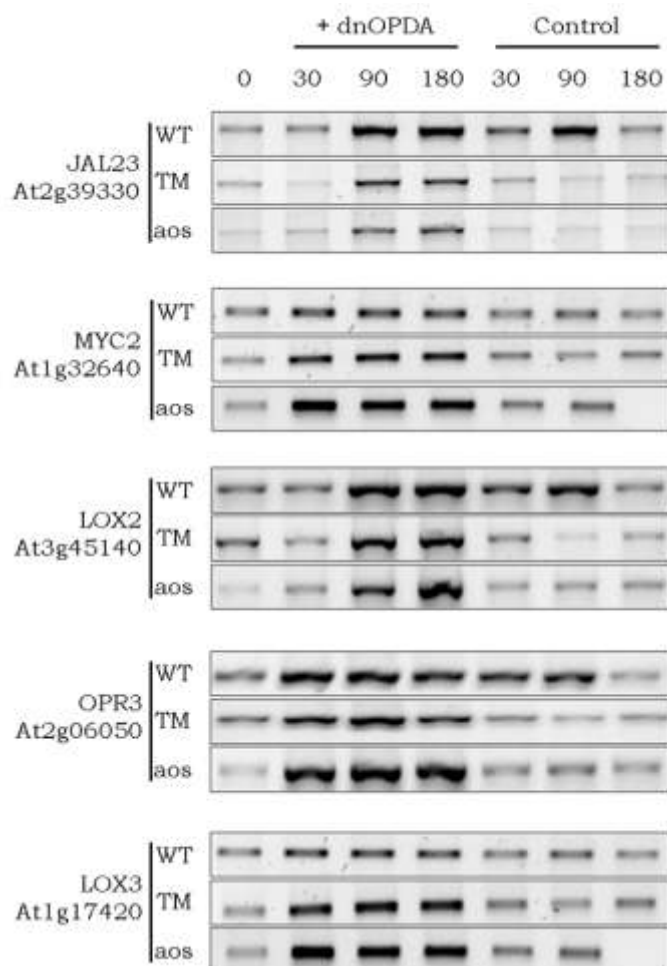


Figura 4.15 Genes que mostraron una clara inducción al suplementar con dnOPDA.

En las PCRs realizadas en el segundo experimento de suplementación se encontraron genes que sí respondían a la suplementación con dnOPDA y genes que no lo hacían. Entre estos últimos había dos tipos, los que se expresaban en modo similar en la línea silvestre y en los mutantes y los que lo hacían de modo diferente y en la mayoría de los casos confirmaron los datos del análisis transcriptómico. Como se muestra en la figura 4.15, en el segundo experimento de suplementación se detectaron genes que mostraban inducción tras la suplementación con dnOPDA.

La inducción de estos genes fue mucho más clara en los mutantes *fad3/fad7/fad8* y *aos* en comparación con la línea silvestre, excepto el gen *JAL23* (At2g39330) que también mostraba una clara inducción en la línea silvestre.

4.3.14. Discusión

La síntesis de jasmónico (JA) desde 16:3, a través del intermedio dnOPDA es conocida desde hace años, gracias al trabajo de Weber y col., (1997) en el que se identificó esta molécula en *Solanum tuberosum* (patata) y *Arabidopsis*, ambas plantas 16:3. En ambas especies se detectó un incremento en el nivel de esta hormona tras la herida, del mismo modo que el OPDA o el JA (Weber y col., 1997). Desde entonces se ha obtenido información de la localización de esta hormona, que se presenta tanto en estado libre como asociada a los galactolípidos cloroplásticos mayoritarios (MGDG y DGDG), formando los Arabidópsidos (Acosta y Farmer, 2010). Sin embargo, el papel del dnODPA como fitohormona, su posible interacción con otras hormonas vegetales, sus genes diana o su función biológica son asuntos que aún no han sido estudiados. Los resultados presentados en este capítulo de Tesis, suponen el primer intento de responder a algunas de estas preguntas. El análisis transcriptómico de los mutantes *fad5* y *fad3/fad7/fad8* en comparación con la línea silvestre, permitió identificar un grupo importante de genes con expresión diferencial en ambas líneas vegetales, los cuales estaban relacionados con el estrés biótico y las respuestas de defensa. La alteración a nivel transcriptómico de estos genes podía ser esperable en el mutante *fad3/fad7/fad8*, ya que al carecer de ácidos grasos trienoicos es incapaz de sintetizar jasmonatos (McConn y Browse, 1996). No obstante, este no es el caso del mutante *fad5*, ya que posee niveles de 18:3 similares a los de la línea silvestre y por lo tanto puede sintetizar JA tal y como muestra la tabla 4.2. Por tanto, la incapacidad de este mutante para sintetizar dnODPA, podría estar detrás de la aparición de genes de

defensa y estrés biótico en su análisis transcriptómico. Es ampliamente conocido que el jasmonico es un regulador negativo del desarrollo de la raíz (Staswick y col., 1992). La alteración en los niveles de oxilipinas en ambos mutantes, podría estar relacionada con las diferencias en cuanto al patrón de desarrollo de la raíz observado tanto para el mutante *fad5* como para el mutante *fad3/fad7/fad8*. Nuestros resultados aportan los primeros indicios de la existencia de genes regulados por dnOPDA. Los experimentos de suplementación realizados sobre genes específicos escogidos del análisis transcriptómico muestran que la expresión de algunos genes varía en respuesta a la suplementación con dnOPDA. Los genes que mostraron una clara inducción tras la suplementación con dnOPDA fueron At2g39330 (*JAL23*), At1g32640 (*MYC2*), At3g45140 (*LOX2*), At2g06050 (*OPR3*) y At1g17420 (*LOX3*) tanto en el mutante *fad3/fad7/fad8* como en el mutante *aos*, sugiriendo que el efecto observado se debe a la presencia de dnOPDA y no a un efecto de estrés general inespecífico debido a la deficiencia de insaturación en los lípidos de membrana. Un hecho llamativo sobre estos resultados es que salvo At2g39330 (*JAL23*) que codifica para una proteína de defensa, el resto de los genes inducidos por dnOPDA son genes relacionados con la biosíntesis de JA (*LOX2*, *LOX3* y *OPR3*) o su señalización (*MYC2*). Una posible explicación es que igual que ocurre con muchos de los genes regulados por OPDA, exista una duplicidad de funciones entre el dnOPDA y el JA. Sin embargo, tampoco se podría descartar que la conversión de dnOPDA en JA se produjera de manera significativa tras la suplementación y que los niveles de JA provocaran la respuesta transcripcional. La identificación de genes regulados por OPDA (y no por JA) en el trabajo de Taki y col., (2005) apoya la hipótesis de la actividad biológica del dnOPDA independiente al JA. Sin embargo serían necesarios experimentos de suplementación con dnOPDA en mutantes incapaces de transformar el dnOPDA en JA, además del análisis de un número más elevado de genes candidatos para determinar la presencia de genes

regulados por esta oxilipina. Además la realización de experimentos de tolerancia a estreses con esos mismos mutantes, como el ataque por patógenos, bajo suplementación de OPDA y dnOPDA podría aclarar de qué capacidades defensivas carecen esos mutantes y cuáles conservan en cada caso, asignando funciones específicas estas oxilipinas. El mutante *opr3* sería un excelente candidato para estos experimentos si no fuera porque se comporta como una planta de la línea silvestre tras el tratamiento con determinados patógenos (Chehab y col., 2011). El conocimiento más exhaustivo acerca de los genes que participan en la transformación de OPDA y dnOPDA en JA (OPCL, KAT, ACH...) y la obtención de mutantes de los mismos será de elevado interés para este tipo de experimentos.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIAL BIOLÓGICO

5.1.1. Cultivo de plantas en condiciones controladas

5.1.1.1. Cultivo de plantas de soja (*Glycine max* L. Merr cv Volania)

La germinación de las semillas de soja se realizó en un lecho con una mezcla de perlita: vermiculita 50 % (v: v) en una bandeja perforada. Las semillas se cubrieron con una fina capa de mezcla porosa y se regaron con abundante agua. Se colocó la bandeja tapada con papel de aluminio en la cámara de cultivo y se destapó al tercer día, sincronizando así la germinación de todas las semillas. En el momento en el que las plántulas habían abierto las hojas simples se llevaron a cultivo hidropónico. El cultivo hidropónico se realizó en solución Hoagland con aireación, renovando la solución nutritiva al menos una vez cada semana. Las condiciones de crecimiento en la cámara fueron $300 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de luz; 24/22 °C (luz/oscuridad) de temperatura; 70 % de humedad relativa y 16h/8h (luz/oscuridad) de fotoperiodo.

Composición de la solución nutritiva de soja: Solución de macronutrientes 5 ml/l; solución de nitrato de calcio 2,5 ml/l; solución de micronutrientes 0,5 ml/l; solución de hierro 0,75 ml/l.

Solución de macronutrientes: KNO_3 50,55 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 49,3 g/l; KH_2PO_4 27,5 g/l; NaCl 5,85 g/l.

Solución de nitrato de calcio: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 313,62 g/l.

Solución de micronutrientes: $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,81 g/l; H_3BO_3 2,86 g/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,23 g/l; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03 g/l.

Solución de hierro: FeNaEDTA 36,71 g/l.

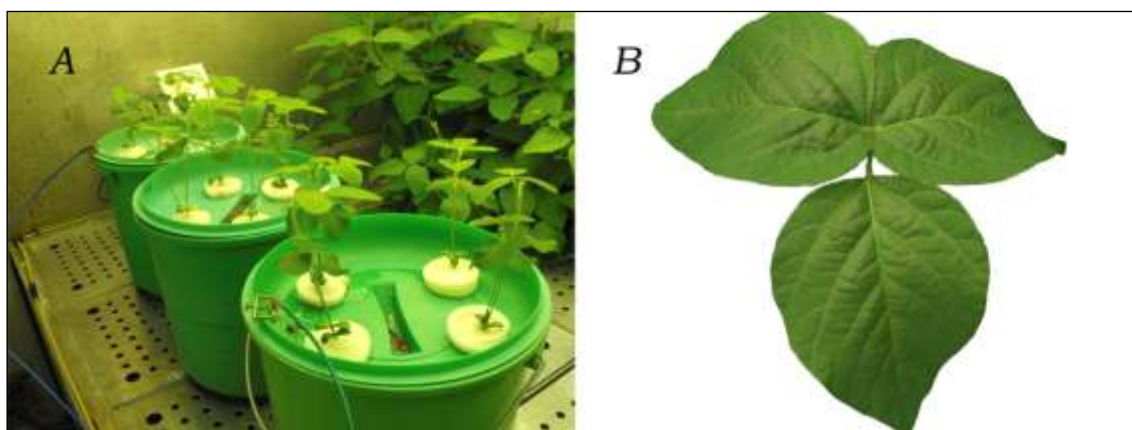


Figura 5.1 (A) Imagen del cultivo de *Glycine max* en medio hidropónico. (B) Detalle de un trifolio de soja.

5.1.1.2. Tratamientos experimentales en plantas de soja (*Glycine max* L. Merr cv Volania)

Las plantas de soja destinadas a los experimentos de fraccionamiento subcelular, purificación y detección de proteínas mediante western blot se crecieron en condiciones control.

Las plantas de soja destinadas a los experimentos de desarrollo también se crecieron en condiciones control. Las semillas en germinación se recogieron a los 3 días de germinación (inmediatamente tras retirar el papel de aluminio) y también a los 6,9 y 12 días de germinación; las hojas trifoliales se etiquetaron cuando los trifolios estaban recién abiertos (RA) y se recogieron a los 3, 7, 14 y 18 días además de los trifolios recién abiertos. Todas éstas muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C hasta su posterior utilización.

5.1.1.3. Cultivo de plantas de *Arabidopsis* (*A. thaliana* L. Heynh cv Columbia y mutantes derivados de ésta)

Para la realización de ésta Tesis Doctoral se han cultivado plantas de *Arabidopsis thaliana* tanto de la línea silvestre (ecotipo Columbia) como de los mutantes *fad5* y *fad3-2/fad7-2/fad8* que presentaban diferentes alteraciones en la ruta de desaturación de ácidos grasos. Éstos mutantes fueron generosamente cedidos por el Dr. John Browse (Washington State University). Además, debido al trabajo de ésta Tesis, se obtuvieron una serie de líneas transgénicas de *Arabidopsis* *AtFAD7:YFP*, *AtFAD6:CFP*, *pEarleyGate101*, *pEarleyGate102*, *GmFAD7-1:YFP* y *GmFAD7-2:YFP*. A continuación se detalla la metodología utilizada en nuestro laboratorio para el crecimiento de plantas de *Arabidopsis*.

5.1.1.3.1. Esterilización y cultivo en placa

La esterilización de semillas de *Arabidopsis* se realizó en una campana de flujo laminar inmediatamente antes de la siembra en placa para la germinación y el cultivo. Las semillas a esterilizar se colocaron en tubos eppendorf distintos para cada línea. Posteriormente, se añadió solución de esterilización (50 % lejía y unas gotas de tween 20) y se incubó durante 3 minutos. El volumen de solución de esterilización utilizado fue en función del número de semillas a esterilizar, aproximadamente 500 µl de solución por cada 100 semillas. Una vez eliminada la primera, se añadió el mismo volumen de etanol al 70 % y se incubó durante 1 minuto. Finalmente se procedió a realizar tres lavados con agua miliQ estéril.

Las semillas esterilizadas se depositaron en placas de MS estériles con la ayuda de una pipeta eppendorf y puntas de 0,5-10 µl estériles, con excepción de la selección de semillas T1 resistentes. Al ser éstas un número elevado (≥ 1000) se

utilizaron volúmenes mayores en la esterilización y se vertieron directamente con el agua del último lavado, repartiéndolas por gravedad.

Una vez evaporada el agua, las placas se sellaron con cinta porosa y se taparon con papel de aluminio guardándolas en la nevera unos 4-5 días para sincronizar la germinación. Posteriormente se trasladaron a la cámara de cultivo para su posterior germinación y crecimiento. Las condiciones de crecimiento en la cámara (Aralab Fitoclima 10000 EHMF) fueron: $150 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz; 22/18 °C (luz/oscuridad) de temperatura; 50 % de humedad relativa y 16h/8h (día largo) ó 11h/13h (día corto) de fotoperiodo, dependiendo del experimento. Las placas se crecieron en posición horizontal (figura 5.2-A) para experimentos de duración corta (0-14 días) y en posición vertical (figura 5.2-B) para experimentos de duración larga o para la propagación de semillas. La posición vertical de la placa favorecía el traspaso de la plántula a la maceta sin dañar la raíz.

Composición del medio MS para placas: Sacarosa 10 g/l, MS 4 g/l, MES hidrate 9,76 g/l, PlantAgar 8 g/l. El medio se esterilizó en un autoclave antes de verter en las placas en una campana de flujo laminar.

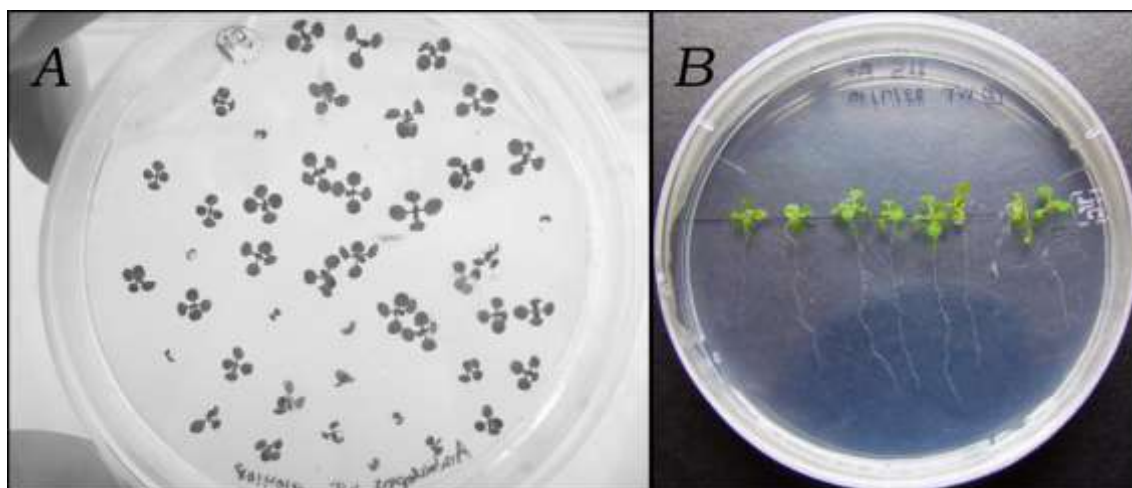


Figura 5.2 Imágenes del cultivo en placa de Arabidopsis thaliana. (A) Crecimiento de la placa en posición horizontal y (B) crecimiento en posición vertical.

5.1.1.3.2. Cultivo en maceta

Aproximadamente dos semanas después de bajar las placas a la cámara de cultivo se pasaron las plantas a maceta. Para ello se llenaron los tiestos con una mezcla de sustrato (Kekkila), vermiculita (3: 1) y fertilizante en concentración 2 g/l y se colocaron en una bandeja, humedeciendo la mezcla con agua destilada. A continuación se traspasaron las plántulas como se puede observar en la figura 5.3-A y 5.3-B y se cubrieron con una tapa transparente para mantener la humedad.



Figura 5.3 (A y B) Imágenes del paso de plantas de Arabidopsis de placa a maceta. (C) Detalle de una roseta de Arabidopsis creciendo en maceta.

La tapa transparente se retiró a los 7-10 días. El aporte de agua se hizo según las necesidades del cultivo, añadiendo por lo menos una vez a la semana solución nutritiva. El desarrollo de las hojas de la roseta dependía del fotoperiodo utilizado, siendo mayor cuando se utilizaba fotoperiodo de día corto. La figura 5.3-C muestra el desarrollo de una roseta de Arabidopsis silvestre en crecimiento con fotoperiodo de día corto.

Composición de la solución nutritiva de Arabidopsis: Solución I 20 ml/l; solución II 10 ml/l; solución III 10 ml/l; solución IV 10 ml/l; solución de hierro 2,5 ml/l y solución de micronutrientes 1 ml/l.

Solución I: KNO₃ 25,28 g/l.

Solución II: KH_2PO_4 34,022 g/l pH 5,5.

Solución III: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 49,296 g/l.

Solución IV: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 47,23 g/l.

Solución de hierro: FeNaEDTA 7,34 g/l.

Solución de micronutrientes: H_3BO_3 4,232 g/l; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2,77 g/l; $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,124 g/l; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,287 g/l; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,0484 g/l; NaCl 0,584 g/l; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,0024 g/l.

5.1.1.3.3. Propagación de semillas de *Arabidopsis*

La propagación consiste en el crecimiento de las plantas de *Arabidopsis* hasta su desarrollo reproductivo completo y la consecuente formación de semillas maduras. Este procedimiento se realizó con los cultivos en maceta. Para favorecer el trabajo con numerosos individuos al mismo tiempo los tallos de las plantas se enrollaron sobre una guía de madera. Posteriormente, cuando las vainas comenzaban a secar, la parte aérea de la planta se introducía en bolsas de recogida de semillas que permiten la transpiración evitando la acumulación de agua. Para la obtención de semillas las plantas en maceta se crecieron en un invernadero (Inkoa sistemas) en condiciones de luz natural, 20 % de humedad relativa y 24/18 °C de temperatura. La figura 5.4 ilustra las condiciones detalladas en éste apartado.



Figura 5.4 Imagen del crecimiento de Arabidopsis en maceta destinado a la propagación de semillas.

5.1.1.3.4. Experimentos de suplementación en Arabidopsis

Para uno de los objetivos de ésta Tesis Doctoral se realizaron experimentos de suplementación con hormonas vegetales en plantas de Arabidopsis. Estos experimentos se realizaron con ácido dinor-oxo fitodienoico (dnOPDA), que es una fitohormona que derivada del ácido graso poliinsaturado 16:3. El dnOPDA fue generosamente proporcionado por Mats Hamberg, (Karolinska Institutet, Estocolmo, Suecia); y se utilizó pulverizándolo sobre plantas de 14 días en la misma placa en la que habían crecido. La hormona se diluyó en agua milliQ estéril a una concentración de 20 μM y las plantas control se trataron con agua milliQ estéril pulverizada.

Durante éste experimento se tomaron muestras de las líneas utilizadas al inicio del experimento (tiempo 0), y a los 30, 60 y 90 minutos de tratamiento, congelándolas en nitrógeno líquido y guardándolas a -80 °C hasta su posterior utilización.

5.1.2. Cultivo líquido de suspensiones celulares de soja (*Glycine max*)

El cultivo en medio líquido es un sistema rápido y eficaz para el crecimiento de células vegetales que proporciona una alternativa a los experimentos con plantas. Para los experimentos realizados en esta Tesis Doctoral se utilizó el medio de cultivo sin sacarosa (KN⁰) lo que proporcionó condiciones de cultivo fotoautótrofas, es decir, dependientes de la luz y del suministro de CO₂ como fuente de carbono. Para ello, las suspensiones celulares se crecieron en un incubador de agitación orbital (New Brunswick Scientific Co., Modelo G-25), en matraces de 125 ml con 50 ml de medio fresco bajo las siguientes condiciones de cultivo: 70 µE m⁻² s⁻¹ de intensidad de luz; 22 °C ± 2 °C de temperatura; 130 r.p.m. de agitación y burbujeo de 5 % de CO₂ en el interior al incubar. En estas condiciones, las suspensiones celulares mantienen un color verde intenso, característico del buen estado de los cultivos. Tras 21 días de cultivo, las células fueron diluidas a 1/3 del volumen total con medio fresco.

Medio KN⁰: 10 % solución de macronutrientes; 1 % solución de micronutrientes; 1 % solución de hierro; 0,1 % solución de tiamina 0,1 g/l; 0,1 % Kinetina 0,20 g/l en HCl 0,5 N; 0,1 % Ácido naftalen-acético 1 g/l en etanol. (Rogers y col., 1987). El pH del medio se ajustó a 5,8 con KOH diluido y se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

Solución de macronutrientes: $(\text{NH}_4)\text{NO}_3$ 16,5 g/l, KNO_3 19,0 g/l, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 4,4 g/l, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3,7 g/l, KH_2PO_4 1,7 g/l.

Solución de micronutrientes: $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 2,230 g/l, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,860 g/l, H_3BO_3 0,620 g/l, KI 0,083 g/l, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,025 g/l, $^*\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 ml/l, $^*\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1 ml/l.

Solución de hierro: $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,72 g/l, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,78 g/l.

Soluciones de Cu y Co: $^\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2,5 g/l, $^*\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 3 g/l.

5.1.3. Fraccionamiento subcelular y purificación

5.1.3.1. Aislamiento de cloroplastos intactos

En el aislamiento de cloroplastos intactos fue necesario tener en cuenta varias circunstancias. En primer lugar fue necesario utilizar el material fresco, preferentemente recogiendo las hojas a primera hora de la mañana, cuando la luz se acababa de encender. Esta precaución se debe a que durante el día las plantas sintetizan almidón almacenándolo en gránulos en sus cloroplastos, y lo consumen durante la noche. Los gránulos de almidón son densos y, dado que el material se sometía a centrifugación para aislar y purificar los cloroplastos, éstas partículas podrían romper las envueltas de los mismos reduciendo el rendimiento de obtención de cloroplastos intactos.

Para el aislamiento de cloroplastos intactos de plantas de soja se partió de 100 g de hojas. Las hojas se lavaron y se eliminaron las venas principales, se cortaron en trozos de 1-3 cm añadiéndolos a una batidora de vaso. Se vertieron 600 ml de medio A con BSA y se batieron haciendo pulsos cortos e intensos con objeto de no sobrecalentar el extracto. La mezcla se filtró a través de 4 capas de papel Miracloth

para eliminar restos grandes de material vegetal sin romper, y el filtrado se centrifugó a 1000 g durante 7 minutos en una centrífuga refrigerada Beckmann Avanti J-20 XP (rotor JS 13.1 swing out). Los sedimentos resultantes, enriquecidos en cloroplastos se resuspendieron en medio A con BSA (2 ml cada uno) y se colocaron suavemente sobre los gradientes de percoll. Éstos se centrifugaron a 3200 g durante 15 minutos. Tras el gradiente, el aspecto de los tubos era el indicado en la figura 5.4.

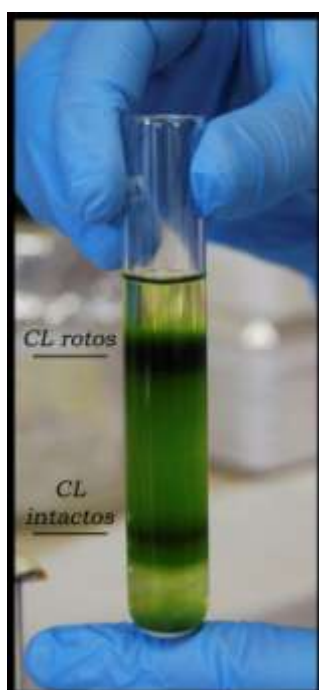


Figura 5.4 Imagen de un gradiente de percoll tras la centrifugación. La banda superior corresponde a los cloroplastos rotos y la inferior, en la interfase de los gradientes de percoll corresponde a los cloroplastos intactos.

Se recogió la fracción de cloroplastos intactos (ver figura 5.4) y se lavó con 3 volúmenes de medio B (centrifugando cada vez a 1700 g durante 1 minuto). El sedimento final se resuspendió en medio B con inhibidores de proteasas, se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80 °C hasta su posterior utilización. Todas las

centrifugaciones se realizaron a 4 °C y el material se mantuvo en hielo siempre que estaba fuera de la centrífuga.

Medio A con BSA: Sorbitol 330 mM; Ácido ascórbico (en fresco) 5 mM; EDTA 2 mM; NaCl 20 mM; MgCl₂ 1 mM; MnCl₂ 1 mM; KH₂PO₄ 0,5 mM; MES-KOH 5 mM; BSA 0,1 %.

Medio B: Sorbitol 330 mM; Ácido ascórbico (en fresco) 5 mM; EDTA 2 mM; NaCl 20 mM; MgCl₂ 1 mM; MnCl₂ 1 mM, NaNO₃ 2 mM, HEPES-KOH 50 mM.

Gradientes de percoll: Del 40 y del 80 % de percoll en medio B. Se añadieron 2,5 ml de gradiente del 80 % y sobre éste con mucho cuidado 5 ml de percoll al 40 %.

Inhibidores de proteasas: 100 µg/ml pefabloc; 1 µg/ml antipaina y 1 µg/ml leupeptina (concentraciones finales).

5.1.3.2. Aislamiento de tilacoides

El aislamiento de tilacoides se realizó partiendo de 20 g de hojas limpias de venas y lavadas. Se batieron en medio F1 con pulsos cortos y se filtraron a través de 4 capas de papel de Miracloth y 2 capas de gasa para eliminar restos grandes de tejido sin romper. El filtrado se centrifugó a 1000 g durante 10 minutos, en una centrifuga Beckmann Avanti J-20 XP (rotor JA 25.50). El sedimento enriquecido en cloroplastos se lavó con medio F3 y se centrifugó a 5000 g durante 7 minutos. El sedimento resultante se resuspendió en M2 y se dejó 5 minutos en hielo para provocar el choque osmótico. La mezcla se centrifugó a 100-300 g durante 3 minutos y el sobrenadante de ésta centrifugación se volvió a centrifugar a 10000 g durante 10 minutos. El sedimento resultante estaba formado por membranas tilacoidales y se resuspendió en medio F4 conteniendo inhibidores de proteasas. Se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80 °C hasta su posterior utilización.

Todas las centrifugaciones se realizaron a 4 °C y el material se mantuvo en hielo siempre que estaba fuera de la centrífuga.

Medio F1: 50 mM Tricina-KOH (pH 7,8); 0,4 M Sorbitol; 10 mM NaCl; 2 mM MgCl_2 ; 0,2 % BSA y 5 % PVP 40.

Medio F3: 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ (pH 7,4).

Medio M2: 5 mM Tricina- $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$ (pH 7,5); 0,1 M Sorbitol.

Medio F4: 2 mM Tris-Malato pH 7,0 y 40 % Glicerol.

Inhibidores de proteasas: 100 $\mu\text{g/ml}$ pefabloc; 1 $\mu\text{g/ml}$ antipaina y 1 $\mu\text{g/ml}$ leupeptina (concentraciones finales).

Se utilizó otro protocolo adicional para el aislamiento de tilacoides que permitía obtener una fracción más purificada de los mismos. Para éste protocolo, se partió de una mayor cantidad de material de partida, 200 g de hojas, que fueron lavadas, eliminando también las venas principales. Las hojas se cortaron en trozos pequeños de 1-3 cm y se batieron con 400 ml de medio A dando pulsos cortos. El homogenizado se filtró a través de dos capas de papel de Miracloth para eliminar restos grandes de material vegetal sin romper. El filtrado se centrifugó a 1000 g durante 3 minutos, centrífuga Beckmann Avanti J-20 XP (rotor JLA 10.500). El sobrenadante se sometió a centrifugación durante 10 minutos a 18600 g. El sedimento de ésta centrifugación, enriquecido en cloroplastos, se resuspendió en medio B y se purificó en tubos con percoll al 35 % centrifugando a 5000 g durante 10 minutos, en una centrífuga Beckmann Avanti J-20 XP (rotor JA 25.50). La fracción de cloroplastos recogida del percoll estaba compuesta mayoritariamente por cloroplastos rotos. Ésta se lavaba dos veces en medio C, centrifugándola a 12000 g durante 10 minutos, en una centrífuga Beckmann Avanti J-20 XP (rotor JA 25.50). El sedimento resultante se resuspendió en medio C y se añadió medio TE para provocar choque osmótico sobre los cloroplastos que aún quedaran intactos,

dejando los tubos durante 10 minutos en hielo para tal efecto. Las muestras se cargaron sobre los gradientes de sacarosa para la purificación de los tilacoides. Los gradientes se ultracentrifugaron a 39000 rpm durante 70 minutos en la ultracentrífuga Beckmann Optima™ XL-100K (rotor SW41 Ti). La fracción purificada de tilacoides se lavó en medio TE, centrifugando a 6000 g durante 10 minutos en una centrífuga Beckmann Avanti J-20 XP (rotor JA 25.50). El pellet que contenía los tilacoides purificados se resuspendió en tampón TE con inhibidores de proteasas. Todas las centrifugaciones se realizaron a 4 °C y el material se mantuvo en hielo siempre que estaba fuera de la centrífuga.

Medio A: 330 mM Sorbitol; 5 mM Ascorbato; 2 mM EDTA; 20 mM NaCl; 1 mM $MgCl_2$; 0,5 mM KH_2PO_4 y 5 mM MES-KOH (pH 6,1).

Medio B: 330 mM Sorbitol; 5 mM Ascorbato; 2 mM EDTA; 20 mM NaCl; 1 mM $MgCl_2$, 1 mM $MnCl_2$; 2 mM $NaNO_3$ y 50 mM HEPES-KOH (pH 7,6).

Medio C: 330 mM Sorbitol y 50 mM HEPES-KOH (pH 8).

Medio TE: 2,5 mM EDTA y 10 mM Tris (pH 7,5).

Inhibidores de proteasas: 100 µg/ml pefabloc; 1 µg/ml antipaína y 1 µg/ml leupeptina (concentraciones finales).

5.1.3.3. Aislamiento de membranas granales del fotosistema II

El aislamiento de membranas del fotosistema II se realizó según el protocolo descrito en Berthold y col., (1981). Se partió de aproximadamente 500 g de hojas frescas que fueron humedecidas y troceadas, posteriormente, se homogeneizaron en una batidora de vaso con 1,5 l de tampón B1. El homogeneizado se filtró a través de una capa de papel de Miracloth y el filtrado se centrifugó a 450 g durante 2 minutos a 4 °C (centrífuga Beckmann Avanti J-20 XP; rotor JLA 10.500). Ambos pasos estaban destinados a la eliminación de los restos de material vegetal sin

romper. El sobrenadante de ésta centrifugación se centrifugó a 18600 g durante 10 minutos a 4 °C. El sedimento de ésta centrifugación, enriquecido en cloroplastos, se resuspendió en tampón B2 con ayuda de un pincel y se volvió a centrifugar a 18600 g, durante 10 minutos a 4 °C. El nuevo sedimento, que contenía principalmente cloroplastos rotos, se resuspendió en tampón B3 de nuevo con pincel diluyéndolo hasta una concentración de clorofila de 3 mg/ml. Posteriormente, se añadió Tritón X-100 al extracto, gota a gota, en relación 25 mg tritón/mg clorofila y se incubó durante 35 minutos con agitación suave, en oscuridad y a 4 °C. Tras éste paso se centrifugó la mezcla a 4650 g durante 5 minutos a 4 °C (centrífuga Beckmann Avanti J-20 XP; rotor JA 25.50). El sedimento de la centrifugación se ultracentrifugó a 82800 g durante 30 minutos a 4 °C (ultracentrífuga Beckmann Optima™ XL-100K, rotor SW28Ti). Finalmente se resuspendió el sedimento en tampón B4. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C hasta su utilización.

Tampón B1: 400 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 20 mM Tricina y 0,2 % BSA (p: v) pH 8,0.

Tampón B2: 150 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 20 mM Tricina y 0,2 % BSA (p: v) pH 8,0.

Tampón B3: 15 mM NaCl; 5 mM MgCl₂ y 50 mM MES pH 6,0.

Tampón B4: 15 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 50 mM MES y 400 mM Sacarosa pH 6,0.

5.1.3.4. Aislamiento de envueltas

El aislamiento de envueltas del cloroplasto se realizó partiendo de 250 g de hojas lavadas y sin nervios. Éstas se batieron en 1,5 l de medio EB de 5 a 10 segundos. El homogeneizado se filtró a través de 4 capas de gasa y 2 capas de papel

Miracloth para eliminar los restos de material vegetal sin romper. El filtrado obtenido se centrifugó a 1500 g durante 15 minutos en la centrífuga Beckmann Avanti J-20 XP (rotor JLA 10.500). El sedimento resultante, enriquecido en cloroplastos, se lavó con tampón EB con BSA y se centrifugó a 1500 g durante 15 minutos (rotor JLA 10.500). El nuevo sedimento, que contenía cloroplastos, se resuspendió en medio TE con 0,6 M sacarosa para realizar posteriormente tres ciclos de congelación descongelación a -20 °C. Éste paso favorece la ruptura de las envueltas por los cristales de hielo. Tras el tercer ciclo de congelación/descongelación se añadieron 2 volúmenes de tampón TE sin sacarosa, quedando la concentración final en 0,2 M y se dejaron los tubos en hielo durante una hora. Este paso es imprescindible para el correcto rendimiento del protocolo pues aquí las envueltas han de separarse de los tilacoides antes de la centrifugación (Ádám Solti, comunicación personal). Transcurrido este tiempo, se centrifugaron las muestras a 4500 g durante 15 minutos (rotor JA 25.50). Las envueltas se encontraban en el sobrenadante, que se recogió y centrifugó a 58500 g durante 65 minutos (rotor JA 25.50). El sedimento estaba enriquecido en envueltas, pero aún contenía restos de tilacoides, por lo cual mantenía el color verde. Este sedimento se resuspendía en tampón TE con 0,2 M sacarosa y las muestras se depositaron en la parte superior de los gradientes de sacarosa. Los gradientes se ultracentrifugaban a 210000 g durante 135 minutos, ultracentrífuga Beckmann Optima™ XL-100K (rotor SW41 Ti).

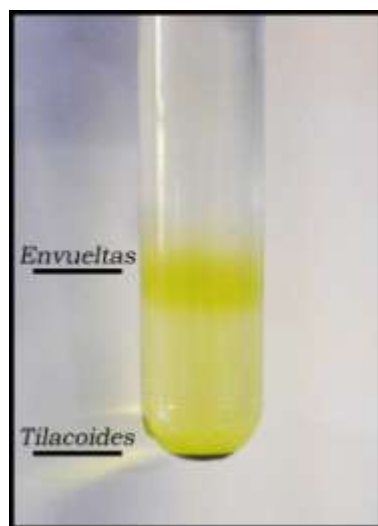


Figura 5.5 Imagen del aspecto del gradiente de sacarosa tras la ultracentrifugación. La banda superior (amarilla) corresponde a las envueltas y el sedimento situado en la parte inferior del tubo (verde) son los tilacoides.

Se recogió la banda correspondiente a las envueltas de cloroplasto y se lavó con medio TE con 0,2 M sacarosa, centrifugando a 75500 g durante 75 minutos (rotor JA 25.50). El sedimento final se resuspendió en 50 μ l de medio TE con 0,2 M sacarosa con inhibidores de proteasas, se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80 °C hasta su posterior utilización. Todas las centrifugaciones se realizaron a 4 °C y el material se mantuvo en hielo siempre que se encontraba fuera de la centrifuga.

Medio EB: 30 mM HEPES-KOH pH 7,8; 330 mM Manitol; 2 mM EDTA; 3 mM $MgCl_2$ y 0,1 % BSA.

Medio TE: 10 mM Tricina; 2 mM EDTA pH 7,8.

Gradientes de sacarosa: Soluciones 1 M sacarosa, 0,46 M sacarosa y 0,2 M sacarosa en medio TE. Se colocaron 3 ml de la solución 1 M sacarosa en un tubo transparente. Sobre éstos, se colocaron 3 ml de la solución 0,46 M sacarosa con

mucho cuidado, y finalmente, sobre éstos últimos, se colocaron 2 ml de la solución 0,2 M sacarosa.

Inhibidores de proteasas: 100 µg/ml Pefabloc; 1 µg/ml antipaina y 1 µg/ml leupeptina (concentraciones finales).

5.2. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS Y MOLECULARES

5.2.1. Determinación de la concentración de clorofila

La determinación de clorofila total se realizó utilizando básicamente el método descrito en Arnon, (1949). Se pesó una cantidad determinada de cada muestra (100 mg) en un tubo y a cada una se añadieron 5 ml de acetona al 80 % en agua. Se mezcló con vórtex y se sonicó durante 3 minutos. Posteriormente el extracto se centrifugó a 9170 g durante 3 minutos a temperatura ambiente en una centrífuga Beckmann Allegra™ 21R (rotor F2402H). Se recogió el sobrenadante y se guardó en hielo. En el caso de observarse restos de clorofila en el sedimento de la centrifugación se repitió el procedimiento de extracción hasta la obtención de un sedimento blanco parduzco. Se midió la absorbancia del extracto a 645 nm, 663 nm y 750 nm y se interpolaron los valores en las fórmulas de Arnon, indicadas a continuación aplicando el factor de dilución correspondiente.

$$\text{Chl}_{\text{TOT}} \text{ mg/l} = 20,2 \cdot \text{Abs}_{645} + 8,02 \cdot \text{Abs}_{663}$$

$$\text{Chl}_a \text{ mg/l} = 12,7 \cdot \text{Abs}_{663} - 2,69 \cdot \text{Abs}_{645}$$

$$\text{Chl}_b \text{ mg/l} = 22,9 \cdot \text{Abs}_{645} - 4,68 \cdot \text{Abs}_{663}$$

5.2.2. Lípidos

5.2.2.1. Extracción de lípidos totales y preparación de los metil-ésteres de los ácidos grasos

Para extraer los lípidos del material vegetal se aplicó el protocolo desarrollado por Bligh y Dyer, (1959). Las muestras (0,5 g) se homogenizaron en presencia de 2 ml de tampón B1. Al lisado se le añadieron 6 ml de la mezcla de extracción metanol: cloroformo (2: 1 v: v). Posteriormente, se agitó la muestra con un vórtex durante 30 s. A continuación, la muestra se centrifugó a 485 g y 4 °C durante 20 min (centrífuga Beckmann Avanti J-20 XP; rotor JA 25.50). Se recogió la fase inferior (orgánica) en la que se encuentran los lípidos con una pipeta pasteur. Se volvió a realizar una extracción con cloroformo sobre la fase acuosa del mismo modo. La mezcla se volvió a centrifugar en las mismas condiciones, y la fase orgánica fue recogida y mezclada con la obtenida en la centrifugación anterior. El disolvente de la fase orgánica obtenida se evaporó con N₂ (g), quedando como residuo seco los lípidos y los pigmentos fotosintéticos.

La síntesis de los metil ésteres se realizó mezclando 1/10 (v/ v) del residuo seco con 3 ml de mezcla de metilar, e incubando durante 1 h a 80 °C. Una vez enfriado tras la reacción se extraían los metil-ésteres con 1 ml de heptano (fase orgánica) y 5 ml de Na₂SO₄ 6,7 % (p: v) (fase acuosa), mezclando con vórtex y centrifugando a 1100 g durante 2 minutos (centrífuga Beckmann Avanti J-20 XP; rotor JA 25.50), recogién dose la fase superior en un tubo nuevo. Este proceso se repitió 3 veces, añadiendo 1 ml de heptano cada vez. Finalmente se procedió a la evaporación del disolvente orgánico. Este residuo se guardó a -20 °C en oscuridad hasta su posterior utilización. Los metil ésteres se enviaron a analizar a la Unidad de Grasas y Lácteos del Laboratorio Agroalimentario (Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente, Gobierno de Aragón).

Tampón B1: 400 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 20 mM Tricina y 0,2 % BSA (p: v) pH 8,0.

Mezcla de metilar: Metanol 88 % (v: v); Tolueno 10 % (v: v) y H₂SO₄ 2 % (v: v).

5.2.3. Proteínas

5.2.3.1. Extracción de proteínas y cuantificación

La extracción de proteínas para posterior análisis mediante SDS-PAGE se llevó a cabo partiendo de 0,5 g de material inicial que fue molido en nitrógeno líquido. El polvo se vertió en un homogeneizador y se añadieron 2 ml de tampón de extracción. La mezcla se homogeneizó durante 2 minutos (5 repeticiones, con descansos de 2 minutos en hielo). En el caso de las muestras de hojas se filtró el homogeneizado a través de 4 capas de papel Miracloth. El filtrado se congeló en nitrógeno líquido antes de guardar las muestras a -80 °C hasta su posterior utilización. En el caso de muestras de semillas o raíces, debido a la mayor turbidez provocada por la presencia de agregados, se centrifugaron a 12400 rpm durante 3 minutos a 4 °C (centrífuga Beckmann Allegra™ 21R, rotor F2402H) guardando el sobrenadante para su posterior utilización.

Tampón de extracción: 0,1M Tris pH 7,5; 20 % glicerol; 1 mM EDTA; 10 mM MgCl₂; 14 mM β-mercaptoetanol (añadir en fresco); 100 µg/ml pefablock; 1 µg/ml antipaina y 1 µg/ml leupeptina.

La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el método espectrofotométrico desarrollado en (Bradford, 1976). Éste método se basa en el cambio del espectro de absorción del colorante azul de coomassie en solución ácida cuando se une a las proteínas, pasando su máximo de absorción de 465 nm a 595 nm. Así pues, la medida de la absorbancia a 595 nm de una solución problema da

una idea de la concentración relativa de proteína que contiene. La cuantificación se realizó siempre utilizando una recta de calibrado con concentraciones conocidas de proteína BSA (0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1 y 2 mg/ ml) que se prepararon mediante diluciones seriadas desde la más concentrada.

La mezcla utilizada para los estándares y las muestras se compone de 10 µl de estándar (o muestra) y 200 µl de reactivo de Bradford (BioRad) en un volumen total de 1 ml. Se prestó atención a que los valores de absorbancia de las muestras estuvieran dentro de los obtenidos en la recta de calibrado, si no ocurría así, la muestra de partida era diluida. La reacción se mezcló con vórtex y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente, procediendo después a medir la absorbancia. Como blanco se utilizó el tampón de resuspensión de proteínas.

5.2.3.2. *Electroforesis SDS-PAGE (unidimensional)*

La separación de proteínas en una dimensión mediante SDS-PAGE se realizó con geles preparados en el laboratorio. La composición de estos geles se indica en la tabla 5.1.

Componentes	Gel separador		Gel concentrador 4%
	12%	15%	
Urea	1,2 ml	1,2 ml	-
Tris-HCl 1,5M pH 8,8	1,25 ml	1,25 ml	625 µl
SDS 10%	50 µl	50 µl	25 µl
Acrilamida/ Bisacrilamida 40%	1,5 ml	1,875 ml	244 µl
APS 10%	25 µl	25 µl	25 µl
TEMED	2,5 µl	2,5 µl	5 µl
V total	5 ml	5 ml	2,5 ml

Tabla 5.1 Composición de los geles de poliacrilamida desnaturalizantes SDS-PAGE, utilizados en la separación de proteínas en una dimensión.

Para la polimerización de los geles se utilizaron cristales de 0,75 mm de espesor. Se preparó en primer lugar el gel separador, dejándolo polimerizar unos 20-30 minutos. Éste se cubrió con isopropanol para evitar la deshidratación durante la polimerización. Una vez polimerizado y tras eliminar el isopropanol, se preparó el gel concentrador. Al añadirlo, se colocó el peine evitando la formación de burbujas y el contacto del gel con el aire. Siempre que se realizaron las mezclas de polimerización se añadió el APS en último lugar, ya que es el iniciador de la reacción. El gel concentrador se mezcló y se añadió sobre el anterior, dejándolo polimerizar también unos 20-30 minutos.

Cuando se iba a usar, se retiraba el peine del gel concentrador, y se lavaban los pocillos con agua milliQ. Se colocaban en la cubeta de electroforesis (BioRad Mini Protean 3 Cell), rellenando el cátodo y el ánodo con tampón de electroforesis hasta cubrir los hilos conductores.

Antes de ser cargadas en los pocillos, las muestras fueron desnaturalizadas a 22 °C durante 30 minutos, con tampón de desnaturalización en proporción 1: 3 (V tampón: V muestra). Además de las muestras, se cargaba en el gel un patrón de peso molecular de una mezcla de proteínas pre-teñidas entre 15 y 110 kDa (Prestained SDS-PAGE standards, Low-range, BioRad). La electroforesis se desarrollaba a 110 V (voltaje constante, fuente BioRad PowerPac™ Basic) dejando salir el frente del colorante del gel. En ocasiones, se dejaba salir también el primer marcador para obtener una mejor separación de las muestras en la zona de pesos moleculares de interés.

Los geles desarrollados se pueden utilizar tanto para la transferencia a membrana como para la tinción con coomassie.

Tampón de electroforesis: 3 g/ l Tris; 14,4 g/ l Glicina y 1 g/ l SDS.

Tampón de desnaturalización: 15,5 mM Tris HCl pH 6,8; 2 % (p: v) SDS; 2,5 % (v: v) Glicerol; 0,02 % (p: v) Azul de bromofenol y 0,0125 % (v: v) β -mercaptoetanol.

5.2.3.3. Tinción con coomassie normal y coloidal

Para la tinción de las proteínas con coomassie normal se incubaron, tras la electroforesis, los geles con la solución de teñido durante toda la noche. Al día siguiente se incubaron durante unos 20 minutos con la solución de desteñido, lavándolos finalmente con agua.

Solución de teñido: 0,25 g/l azul de coomassie; 45 % Metanol (v: v) y 6 % Ácido acético glacial (v: v).

Solución de desteñido: 12,5 % Metanol (v: v) y 37,5 % Ácido acético glacial (v: v).

Para la tinción de las proteínas con coomassie coloidal (más sensible y compatible con la secuenciación) se incubaron los geles durante 1 hora con la solución de fijado. Posteriormente se lavaron 3 veces durante 20 minutos con agua destilada. Tras éste paso, se incubaron durante 1 hora con la solución de incubación y transcurrido éste tiempo, se añadió la solución de teñido. Los geles se dejaron con agitación suave toda la noche y al día siguiente, se lavaron con agua.

Solución de fijación: 50 % Metanol y 2 % Ácido fosfórico.

Solución de incubación: 34 % Metanol; 17 % NH_4SO_4 y 2 % Ácido fosfórico.

Solución de teñido: 1 % Coomassie G-250 y 33 % Metanol.

5.2.3.4. Transferencia y detección inmunológica de proteínas

5.2.3.4.1. Transferencia

Para transferir las proteínas de cada gel fue necesario cortar una membrana del tamaño del gel (en nuestro caso, la membrana utilizada era de PVDF) y dos trozos de papel whatman del tamaño de las esponjillas. El gel sin teñir, se dispuso junto a la membrana de transferencia y a ambos lados de éstos se colocó un papel Whatman y una esponjilla, todo el sistema estaba empapado en tampón de transferencia. Cada sistema estaba incluido en un soporte, que se introducía en la celda de transferencia (BioRad, Mini Trans Blot Cell) con la orientación adecuada. En la cubeta de transferencia se colocaba la celda de transferencia con los soportes y la unidad de refrigeración para evitar la acumulación de calor rellenándolo todo con tampón de transferencia. La transferencia se realizaba durante 90 minutos a 100 V (voltaje constante, fuente BioRad PowerPac Basic).

Transcurrido el tiempo de transferencia, los geles se teñían con coomassie normal para comprobar que la transferencia había ocurrido sin problemas y las membranas se lavaban 3 veces durante 5 minutos con medio TTBS y posteriormente se bloqueaban con leche en polvo desnatada al 5 % (p/v) en TTBS durante toda la noche a 4 °C con agitación.

Tampón de transferencia: 3 g/ l Tris y 14,4 g/ l Glicina.

Tampón TBS: 3 g/ l Tris y 9 g/ l NaCl (pH 7,5).

Tampón TTBS: 0,05 % (v: v) Tween-20 en tampón TBS.

5.2.3.4.2. Detección inmunológica de proteínas

La detección de proteínas con anticuerpos se realizaba a temperatura ambiente sobre la membrana bloqueada. Para ello, la membrana se lavaba 3 veces durante

10 minutos con TTBS en agitación para eliminar el exceso de solución de bloqueo, posteriormente se incubaba con el anticuerpo primario durante 90 minutos también con agitación. En el caso del anticuerpo antiGmFAD7, se preparaba en TTBS con 1 % (p/v) de leche en polvo desnatada y la dilución utilizada fue de 1:200. Para los diversos controles se utilizaron las condiciones que se indican en los apartados posteriores, pero manteniendo siempre la misma dilución de anticuerpo primario. El resto de anticuerpos primarios utilizados se prepararon en TTBS sin leche y a las diluciones indicadas por las casas comerciales (Anti LHCII 1:2000, anti PsbA (AS05 084, Agrisera) 1:1000, anti Tic40 (AS10-709 10, Agrisera) 1:2500 y anti GFP (ab290, ABCAM) 1:2000. Tras la incubación con el anticuerpo primario se hicieron 3 lavados de 15 minutos cada uno con TTBS (en agitación). A continuación se incubó la membrana con el anticuerpo secundario, éste se preparó en TTBS con 5 % (p/v) de leche en polvo desnatada y a dilución 1:25000. En esta Tesis Doctoral se utilizaron dos tipos de anticuerpos secundarios (Goat anti Rabbit y Donkey anti Rabbit). Ambos anticuerpos llevan conjugada una peroxidasa de rábano.

El método empleado para la detección de proteínas se basa en la transformación de un sustrato quimioluminiscente por la peroxidasa de rábano conjugada al anticuerpo secundario, al producirse ésta reacción se desprende luz que puede ser captada por una película de auto radiografía. Para la detección de señal, la membrana se incubó durante 5 minutos con 1 ml de la mezcla de reactivos Supersignal West Pico Chemiluminiscent (Thermo Scientific) a temperatura ambiente. Posteriormente se eliminó el exceso de reactivo y la membrana se colocó entre dos láminas transparentes dentro del cassette de revelado. Se marcaron los bordes y, en oscuridad, se colocó una película de autoradiografía sobre la membrana. Ésta se dejó imprimir el tiempo necesario y antes de sacarla se marcaron los bordes de la película sobre la lámina transparente superior. El revelado de la película se realizó durante 3 minutos en la solución T-Max

profesional Kodak, diluida 1:33 (v: v). Posteriormente se lavó durante un minuto en agua destilada y se procedió al fijado durante 1 minuto en un baño de solución fijadora Polymax, Kodak, diluida 1:5 (v: v). Todas las películas se digitalizaron en un escáner EPSON Perfection 4870 PHOTO.

5.2.3.5. Controles utilizados en la detección inmunológica de proteínas

5.2.3.5.1. Suero preinmune

El suero preinmune es el suero del conejo utilizado en la producción del anticuerpo, antes de ninguna inmunización. De éste modo, se debe utilizar como control en la misma cantidad que el anticuerpo primario y en las mismas condiciones. Estas cantidades pueden variar en el caso de que los anticuerpos primarios hayan sido purificados. Siempre se acompañó cada control con un revelado con el anticuerpo, así pues siempre se prepararon dos geles idénticos.

5.2.3.5.2. Inmunodepleción (anticuerpos desde péptidos sintéticos)

La inmunodepleción se utiliza en el caso de los anticuerpos sintetizados a partir de péptidos sintéticos. Éstos anticuerpos se obtienen de la inmunización de un animal (en nuestro caso un conejo) con un complejo formado por una proteína transportadora de gran tamaño (en nuestro caso KLH, Keyhole Limphet Hemocyanin) que sirve para anclar un gran número de péptidos sintéticos con la secuencia diana de nuestra proteína. La secuencia del péptido sintético elegida para la síntesis e inmunización en éste caso fue: VASIEEEQKSVDLTNG.

La inmunodepleción consiste en la incubación previa del anticuerpo con el péptido sintético, de éste modo, los sitios específicos del anticuerpo quedan bloqueados y sólo se detectan por western blot las bandas inespecíficas.

Los controles de inmunodepleción realizados durante ésta Tesis Doctoral se realizaron utilizando dos tipos de incubación del anticuerpo primario con el péptido sintético. Siempre se hizo una detección con anticuerpo sin inmunodeplecionar en una membrana idéntica para la comparación.

Inmunodepleción tipo I: La incubación se realizó con 50 µl de anticuerpo primario (volumen usado en una membrana normal) y 100 µl de solución 1 mM de péptido en un tubo de PCR. Se dejó incubar toda la noche a 4 °C, con agitación suave. El anticuerpo sin inmunodeplecionar utilizado en la membrana gemela también se sometió a las mismas condiciones. Al día siguiente, cada anticuerpo era utilizado en su membrana del mismo modo descrito anteriormente para el anticuerpo primario, llevando el volumen final hasta 10 ml con TTBS e incubando la membrana durante 1 h y 30 minutos.

Inmunodepleción tipo II: La incubación se realizó con los mismos volúmenes de anticuerpo primario y péptido sintético indicados en el tipo I, pero el volumen final se llevó a 5 ml con TTBS en un tubo clip. Se dejó incubar toda la noche a 4 °C con agitación suave. El anticuerpo sin inmunodeplecionar utilizado en la membrana gemela también se sometió a las mismas condiciones. Al día siguiente, cada anticuerpo era utilizado en su membrana del mismo modo, llevando el volumen final hasta 10 ml con TTBS e incubando la membrana durante 1 h y 30 minutos.

5.2.3.5.3. Anticuerpo secundario

El revelado con anticuerpo secundario pretende establecer si existe alguna interacción entre el anticuerpo secundario y las proteínas de la muestra cargada en el gel.

El revelado con anticuerpo secundario se realizó incubando la membrana únicamente con éste anticuerpo. Para mantener las condiciones de detección

idénticas entre membranas (una membrana idéntica sí se revelaba con anticuerpo primario y servía de control) se incubó con 1 % (p/v) de leche en polvo desnatada en TTBS (sin anticuerpo primario).

5.2.4. Ácidos nucleicos

5.2.4.1. Extracción de RNA de tejidos vegetales, purificación y cuantificación

El RNA de tejidos vegetales se extrajo usando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Life Technologies™) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se partió de 0,1 g de material homogeneizado en nitrógeno líquido. Se le añadió 1ml de reactivo TRIzol y se homogeneizó durante 2 minutos, dejando 5 minutos a temperatura ambiente para la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. De acuerdo al proceso se añadieron 0,2 ml de cloroformo y se mezcló por vórtex durante 15 segundos. La mezcla se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2-3 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C, en una centrifuga Beckmann Allegra™ 21R (rotor F2402H). La mezcla se separaba en varias fases, siendo la superior (acuosa) donde se encontraba el RNA. Se recogió la fase superior con cuidado y se transfirió a un tubo nuevo. A ésta fase se le añadieron 0,5 ml de isopropanol. Se invirtió el tubo con cuidado y se dejó a temperatura ambiente durante 10 minutos para favorecer la precipitación de los ácidos nucleicos. Se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a 4 °C, en una centrifuga Beckmann Allegra™ 21R (rotor F2402H). El sedimento resultante se lavó con 75 % etanol en agua con DEPC, mezclando por vórtex y centrifugando a 7500 g durante 5 minutos a 4 °C, en una centrifuga Beckmann Allegra™ 21R (rotor F2402H). El sedimento de RNA total se dejó secar al aire durante 5-10 minutos y

posteriormente se resuspendió en agua con 0,1 % de DEPC procediendo a su cuantificación utilizando un NANODROP 2000C, Thermo Scientific. Las medidas se hicieron utilizando 1 µl de muestra y el blanco se hizo con 1 µl de agua con 0,1 % de DEPC.

La purificación del RNA se realizó con el kit de extracción y purificación RNeasy Plant Mini Kit de Quiagen®, utilizando únicamente las columnas de purificación. Del RNA extraído se tomaron 100 µg y se llevaron hasta 100 µl con agua libre de RNAsas. Posteriormente se añadieron 350 µl de tampón RLT con β-mercaptoetanol 1 % (v: v) y 250 µl de etanol, mezclándose por pipeteo. La mezcla se transfirió a la columna de purificación y se centrifugó a 10000 rpm durante 15 segundos, 20°C, centrífuga Beckmann Allegra™ 21R (rotor F2402H). Se hicieron dos lavados de la columna con tampón RPE para eliminar cualquier molécula de la mezcla excepto el RNA, centrifugando a 10000 rpm durante 15 segundos, 20 °C en la misma centrífuga. Posteriormente se centrifugó una vez la columna y se dejó un minuto abierta al aire para eliminar posibles restos de tampón RPE. Finalmente se colocó sobre un tubo de recogida y se eluyó el contenido con 30-40 µl de agua libre de RNAsas. Se procedió a su cuantificación utilizando ésta vez agua libre de RNAsas como blanco. Los RNAs se congelaron en nitrógeno líquido y se guardaron a -80 °C hasta su posterior utilización.

Agua con 0,1 % de DEPC: 0,1 % DEPC en H₂O milliQ. Esterilizar en autoclave.

5.2.4.2. Tratamiento DNAsa y síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó tras someter el RNA purificado al tratamiento de DNAsa utilizando, para éste efecto, la DNAsa I recombinante RNase-free de Roche Applied Science. Se utilizó 1 µl de DNAsa por cada 30 µg de RNA purificado durante 15 minutos a 37 °C y posteriormente se inactivó a 75 °C durante 10 minutos. En último lugar, se procedió a cuantificar la concentración de RNA total.

Para la síntesis de cDNA se tomaron de 3 a 5 µg de RNA total, purificado y tratado con DNasa y se añadieron 1,37 µl de OligodT 50 µM/ µg de RNA, y se llevó hasta 15 µl utilizando agua con DEPC. Se incubó la mezcla a 70 °C durante 5 minutos y después se mantuvo en hielo durante 5 minutos, evitando así la formación de estructuras secundarias en el RNA. Posteriormente, se añadió un mix con 5 µl de tampón de retrotranscripción (Promega), 2 µl de mezcla de dNTPs 10mM (Biotools), 1 µl de RNase Out (Invitrogen, Life Technologies™), 1 µl de enzima retrotranscriptasa M-MLV (Promega) y se llevó cada reacción a 25 µl totales. Las reacciones se mantuvieron a 42 °C durante 75 minutos. Para eliminar el RNA de las muestras de cDNA se trató con RNasa H de *E.coli* (Invitrogen, Life Technologies™) a 37 °C durante 20 minutos y posteriormente se llevaron las muestras a 120 µl totales y se almacenaron a -20 °C hasta su posterior utilización.

5.2.4.3. PCR semicuantitativa

La técnica de PCR semicuantitativa se utilizó para estudiar la expresión relativa de los genes en diferentes muestras. La amplificación de fragmentos de DNA se realizó tanto sobre DNA genómico como sobre cDNA, utilizando cebadores específicos de los genes a amplificar. Un ejemplo se muestra en el caso de las PCR de soja en la tabla 5.2.

Gen	Tm PCR	t Ext (s)	Ciclos	Amplificón	Cebador "forward"	Cebador "reverse"
<i>EF1</i>	55	15	35	274	CTATGCCCCTGTCCTCGAC	GGTAGGATCCTTCTTCTCAACGT
Actina	46	45	31	350	ATTGTAGGTCGTCCTCGTC	TTGCATAAAGTGAAAGAACAG
<i>GmFAD3</i> (A+B)	53	90	33	917	GACAACTGGCTTCTCTGGCT	CTCAGTCTCGTTGCGAGTGGA
<i>GmFAD7-1</i>	52	60	40	800	GGA/GTATTATCAGAATGTA/GGCTTGA	CCCCAAAGGTACACGGGATATGC
<i>GmFAD7-2</i>	56	60	40	800	GGGTATTATCAGAATGTAGCTTGAAGC	CCCCAAAGGTACACGGGATATGC
<i>GmFAD8-1</i>	57	30	35	512	AAGTTGTGTTCTGTTGTGAATATCT	TCCTCAACAACCCCATTAGC
<i>GmFAD8-2</i>	57	30	35	507	TATACCAGTTGTCAATTTGTCATATC	CTCACCAACCCCATTAGC

Tabla 5.2 Oligos utilizados en la PCR semicuantitativa en soja y condiciones de PCR.

Los códigos de acceso de los genes de las ω -3 desaturasas analizadas en esta Tesis Doctoral son: *GmFAD3A* (Glyma14g37350), *GmFAD3B* (Glyma02g39230), *GmFAD7-1* (Glyma18g43210), *GmFAD7-2* (Glyma07g18350), *GmFAD8-1* (Glyma01g29630) y *GmFAD8-2* (Glyma03g07570). Las reacciones se llevaron a cabo principalmente en un Termociclador GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems™). Se han usado diversas polimerasas dependiendo del objetivo final de la PCR, para la amplificación rutinaria en estudios de expresión relativa se utilizó la BIOTAQ™ Red DNA Polimerasa de Bioline; y para la amplificación de fragmentos que posteriormente iban a servir para clonación, secuenciación y sobreexpresión se utilizó la Phusion® High Fidelity DNA Polymerase de Finnzymes (Thermo Scientific). Las condiciones de amplificación utilizadas con la polimerasa de Bioline consistían básicamente en una primera etapa de desnaturalización a 94 °C, seguida de tres etapas (desnaturalización a 94 °C, hibridación de los oligos a una temperatura específica y extensión a 72 °C 15- 30 segundos/ kb) que se repiten un número de veces variable según el gen amplificado (ciclos) y concluye con una etapa final de extensión a 72 °C durante 7 minutos. Ésta enzima introduce una Adenina en posición 3' del DNA sintetizado. En los ensayos de expresión relativa se utilizaron al

menos dos genes de referencia para poder cuantificar la expresión de los genes de interés.

En el caso de la amplificación con la polimerasa de Finnzymes (Thermo Scientific) las condiciones que se utilizaron en cada PCR fueron 98 °C para la desnaturalización y también 15- 30 segundos/ kb de extensión, en el caso de la temperatura de hibridación hubo que prestar especial atención a las especificaciones del fabricante y utilizar el software ofrecido por la casa comercial http://www.finnzymes.com/tm_determination.html para calcular la temperatura de hibridación de los oligos; de tal manera que algunas amplificaciones se hacían con ciclos de 2 etapas y otras con ciclos de 3. Las condiciones de amplificación de los genes utilizadas (para Gateway) en ésta Tesis Doctoral se detallan posteriormente en la tabla 5.4.

Las mezclas de reacción de PCR para cada tipo de enzima se detallan en la tabla 5.3.

Componentes	µl para BIOTAQ™	Componentes	µl para Phusion®
Tampón 10xNH4	2	Tampón HE	4
50 mM MgCl2	2	10 mM dNTP mix	0.25
10 mM dNTP mix	1	Cebador "forward"	1
Cebador "forward"	1	Cebador "reverse"	1
Cebador "reverse"	1	H2O	9.55
H2O	8.5	Taq	0.2
Taq	0.5	V total	20
V total	20		

Tabla 5.3 Mezclas de reacción utilizadas con las diferentes Taq polimerasas.

5.2.4.4. *Análisis de los productos de PCR y cuantificación relativa*

El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa. La concentración de agarosa utilizada mayoritariamente fue del 1 %, si en algún caso fue necesario se utilizó una concentración mayor (≤ 2 %) para fragmentos muy pequeños o menor ($\geq 0,7$ %) para fragmentos muy grandes. El gel se preparó con agarosa fundida en TBE. Una vez fundida se añadió SybrSafe (Invitrogen, Life Technologies™) en relación 1:10000 (v: v) dejándolo polimerizar al menos durante 30 minutos. Una vez polimerizado, se cargaron las muestras en los pocillos. En el caso de las PCRs realizadas con la enzima BIOTAQ™ Red DNA Polimerase de Bioline, al contener ésta alta concentración de glicerol y colorante, se cargaban directamente en el gel. Las PCRs realizadas con la enzima Phusion® High Fidelity DNA Polymerase de Finnzymes (Thermo Scientific) que no tiene colorante, se cargaron en el gel mezclándolas con tampón de carga en relación 5: 1 (v muestra: v tampón). La electroforesis se realizó en una cubeta de electroforesis (BioRad) con tampón TBE normalmente a 100 V (voltaje constante) y 300 mA. Las imágenes de los geles se tomaron con un equipo de captura de imagen (Gel Doc, BioRad) utilizando el software de análisis de imagen Quantity One (BioRad).

Tampón TBE 1X: Tris 10,8 g/ l; H₃BO₃ 6,875 g/ l y 2 mM EDTA pH 8,0.

Tampón de carga 6X: 0,25 % (p: v) Orange G y 30 % Glicerol.

La cuantificación relativa de la intensidad de las bandas se realizó utilizando el software de análisis de imagen Quantity One (BioRad) y posteriormente haciendo una normalización de los datos y un tratamiento estadístico. En primer lugar se eliminó el ruido de fondo y luego se cuantificó la intensidad de las bandas detectadas en cada carril. Los datos de cuantificación se trasladaron a una hoja Excel donde fueron posteriormente tratados. Se estableció la variación de cada gen de referencia (R) respecto del primer punto del experimento (figura 5.6-A),

obteniendo así las correcciones para cada gen de estudio. La variabilidad media de los genes de referencia se estableció para utilizarla como factor de corrección. Posteriormente se estableció la variación en cada gen de estudio (E) respecto del primer punto del experimento (figura 5.6-B). Finalmente se les aplicó la corrección media de los genes de referencia, obteniendo las variaciones corregidas de cada gen de estudio (figura 5.6-C). Se asumió siempre que el valor de la variación del control en el primer punto del experimento era 0. De los valores obtenidos de diferentes repeticiones biológicas se calculó la media, la desviación estándar y se hizo el análisis estadístico.

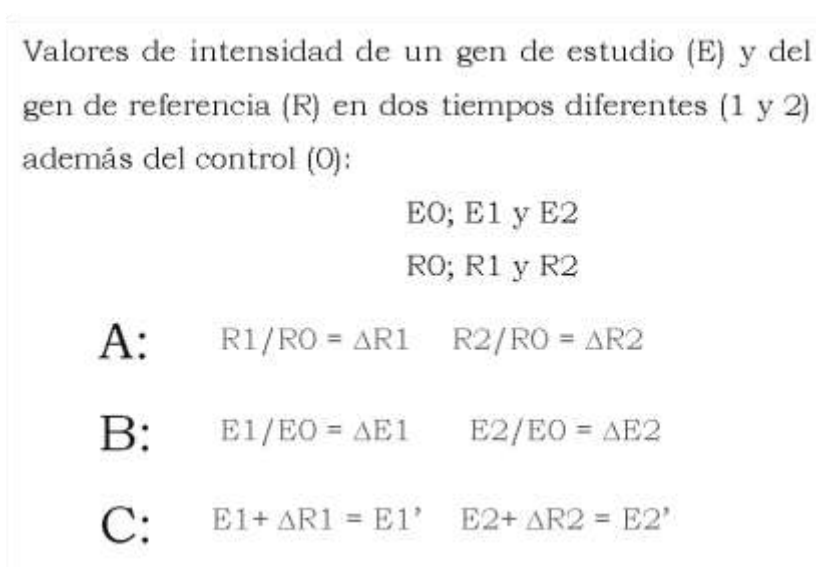


Figura 5.6 Esquema del tratamiento de datos efectuado para la cuantificación relativa.

5.2.4.4.1. Extracción de los productos de PCR de geles de agarosa y purificación

La extracción y purificación de los productos de PCR de geles de agarosa se realizó con el kit GeneJET™ Gel Extraction de Fermentas, Thermo Scientific. Los productos de PCR se visualizaron bajo luz ultravioleta y se cortaron con un bisturí las bandas objeto de interés, colocándolas cada una en un tubo eppendorf. Se pesó la cantidad de gel en cada caso y se añadieron 100 µl de tampón de unión por cada

0,1 g de gel cortado, incubando a 55 °C durante 10 minutos para que la agarosa fundiera de nuevo. Una vez fundida, se transfirió la solución a una columna de purificación y se centrifugó a 15500 g durante 1 minuto, centrífuga Beckmann Allegra™ 21R (rotor F2402H). Si la PCR se iba a utilizar para secuenciar se efectuaba un paso más en el protocolo añadiendo 100 µl de tampón de unión y volviendo a centrifugar del mismo modo. Posteriormente se procedía a lavar con 700 µl de tampón de lavado, centrifugando a 15500 g durante 1 minuto en la misma centrífuga. La columna se centrifugó sola de nuevo y se dejó abierta durante 1 minuto a temperatura ambiente para eliminar los restos de de tampón de lavado. Finalmente se colocó la columna sobre un tubo nuevo y se añadieron 30 µl de tampón de elución, centrifugando a 15500 g durante 1 minuto. Las muestras purificadas se volvieron a cargar en un gel de agarosa para visualizarlas en una electroforesis.

5.2.4.4.2. Preparación de células competentes de *Escherichia coli* (DH5α)

Se utilizaron de partida células DH5α de *E.coli* sin transformar, que se sembraron en una placa con LB sin antibiótico y se cultivaron a 37 °C toda la noche. Al día siguiente, se tomó una colonia individual y se sembró en 2 ml de LB líquido, que se creció a 37 °C con agitación constante durante toda la noche. Del cultivo líquido se sembraron 500 µl en un volumen de 50 ml de LB (por duplicado). Éste cultivo se creció a 37 °C con agitación constante durante 2-3 horas hasta que alcanzó una densidad óptica (D.O.) a 600 nm entre 0,5 y 0,6. Una vez alcanzada, se trabajó con ellos en hielo. Se trasvasaron los cultivos a tubos falcon de 50 ml y se centrifugaron a 2000 g durante 5 minutos a 4 °C en una centrífuga Beckmann Avanti J-20 XP (rotor JS-5.3). Tras eliminar el sobrenadante por decantación, se resuspendió suavemente el sedimento con 15 ml de tampón TB1. Se centrifugaron

a 2000 g durante 5 minutos a 4 °C y se decantó el sobrenadante de nuevo. Finalmente se resuspendieron en 2 ml de tampón TB2 y se distribuyeron en alícuotas de 100 µl, congelándolas en nitrógeno líquido y guardándolas a -80 °C hasta su uso. Se comprobó siempre su capacidad de transformación con un plásmido habitual.

Tampón TB1: 30 mM CH₃CO₂K; 50 mM MnCl₂·4H₂O; 100 mM RbCl₂; 10 mM CaCl₂·2H₂O y 15 % Glicerol; pH 5,8 con ácido acético. Filtrar para esterilizar.

Tampón TB2: 10 mM MOPS; 75 mM CaCl₂·2H₂O; 10mM RbCl₂ y 15 % Glicerol; pH 7 con HCl. Filtrar para esterilizar.

5.2.4.4.3. Transformación de células competentes de *Escherichia coli* (DH5α)

Para la transformación de células competentes DH5α de *E.coli* se extrajo un tubo de células competentes del -80 °C y se mantuvo en hielo durante 5 minutos. Al vial de células se le añadieron 2 µl de la mezcla de ligación y se dejó la mezcla en hielo durante 20 minutos. La transformación se realizó durante 30 segundos a 42 °C tras los cuales, el vial se colocó rápidamente en hielo. Se mantuvo durante 5 minutos y posteriormente se añadieron 250 µl de medio LB, incubando las células durante 1 hora a 37 °C en agitación continua. Pasado ese tiempo se sembraron en placa de LB con la selección adecuada al vector y se dejó crecer toda la noche a 37 °C.

5.2.4.4.4. Cultivo de células de *Escherichia coli* (DH5α)

El cultivo de células de *E. coli* se realizó de dos modos diferentes, dependiendo del objetivo del cultivo. Por un lado, se cultivó en medio sólido cuando el objetivo era obtener diferentes colonias o clones de bacterias, por otro lado se utilizó el cultivo en medio líquido cuando el objetivo era amplificar el número de individuos

de una misma colonia. El trabajo con células de *E. coli* se realizó siempre en campana de flujo laminar bajo condiciones de esterilidad. El cultivo en medio sólido se hizo en placas con LB y la resistencia adecuada al plásmido con el que se transformó. Siempre se partió de una cantidad pequeña de células iniciales y se sembraron en la placa con un asa estéril. La placa se cultivó a 37 °C toda la noche.

El cultivo en medio líquido se realizó en tubos cerrados, utilizando 4 ml de medio LB líquido y el marcador selectivo adecuado al plásmido con el que se transformó. Cada colonia individual obtenida en una placa de selección se recogió con una punta de pipeta estéril y se depositó en el medio líquido, para el crecimiento se aplicó un pulso de vórtex y se incubó a 37 °C con agitación continua durante toda la noche.

Medio LB líquido: LB comercial 15,5 g/l pH 7,2.

Medio LB sólido: Medio LB líquido con agar bacteriano 1,5 % (p: v).

5.2.4.4.5. Aislamiento de DNA plasmídico y digestión con enzimas de restricción

La extracción de DNA plasmídico desde cultivos líquidos de *E. coli* se hizo partiendo de 3 ml de cultivo crecido durante 24 h a 37 °C utilizando el kit comercial GeneJET™ Plasmid Miniprep de Fermentas, Thermo Scientific. Se precipitaron las bacterias a 15500 g durante 2 minutos en tubos eppendorf (centrífuga Beckmann Allegra™ 21R, rotor F2402H). Al sedimento se añadieron 250 µl de solución de resuspensión, mezclando por vórtex. Posteriormente se añadieron 250 µl de solución de lisis y se invirtieron los tubos de 4 a 6 veces. A continuación se añadieron 350 µl de solución de neutralización y se mezcló también por inversión. La mezcla se centrifugó a 15500 g durante 5 minutos. El sobrenadante se trasvasó a una columna y se centrifugó a 15500 g durante 1 minuto. La columna se trató

dos veces con 500 µl de solución de lavado, centrifugando a 15500 g durante 1 minuto. Después se centrifugó una tercera vez y se dejó abierta a temperatura ambiente durante 1 minuto para eliminar los restos de solución de lavado. La columna se colocó sobre un tubo nuevo y se añadieron 40 µl de solución de elución, dejando durante 1 minuto a temperatura ambiente y posteriormente centrifugando a 15500 g durante 2 minutos. El DNA plasmídico se guardó a -20 °C hasta su posterior utilización.

La digestión del DNA plasmídico se llevó a cabo mediante el uso de enzimas de restricción específicas para cada caso (Fermentas, Thermo Scientific), siguiendo siempre las condiciones establecidas por el fabricante.

5.2.4.5. Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico se realizó según lo descrito en Edwards y col., (1991). Un trozo de aproximadamente 1 cm² de hoja de roseta se homogeneizó durante 10-15 segundos en un tubo eppendorf. Se añadieron 400 µl de tampón de Edwards y se mezcló por vórtex durante 5 segundos. Las mezclas se mantuvieron a temperatura ambiente durante la preparación. Las muestras se centrifugaron a 15500 g durante 1 minuto; centrífuga Beckmann Allegra™ 21R (rotor F2402H). Se transfirieron 300 µl de sobrenadante a un tubo nuevo y se mezclaron con 300 µl de isopropanol, se incubaron a temperatura ambiente durante 2 minutos y se volvió a centrifugar a 15500 g, durante 5 minutos. En éste punto se decantó el sobrenadante y se dejó secar al aire durante 5-10 minutos. El DNA genómico se resuspendió en 25 µl de agua milliQ estéril, utilizando 1 µl como molde en las PCRs. En los casos en los que no hubo amplificación se probó con la muestra diluida 1/20.

Tampón de Edwards: 200 mM Tris-HCl pH 7,5; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA pH 8,0 y 0,5 % SDS.

5.2.4.6. Análisis transcriptómico

5.2.4.6.1. Material biológico y diseño experimental

Para la realización de los experimentos de transcriptómica en ésta Tesis Doctoral se han cultivado plantas de *Arabidopsis thaliana* tanto de la línea silvestre (ecotipo Columbia) como de los mutantes *fad5* y *fad3-2/fad7-2/fad8* que presentaban diferentes alteraciones en la ruta de desaturación de ácidos grasos. Todas las plantas se crecieron siguiendo la metodología detallada en el apartado 5.1.1.3. Estos mutantes fueron generosamente cedidos por el Dr. John Browse (Washington State University).

El diseño experimental del experimento de transcriptómica realizado durante se describió en la anterior Tesis Doctoral del grupo, y se resume a continuación. Con el objetivo de disminuir al máximo la variabilidad experimental y poder así diferenciar cambios reales en la expresión génica, se realizaron dos experimentos independientes con tres replicas biológicas por experimento (utilizando entre 25-35 plantas de cada línea por réplica biológica).

5.2.4.6.2. Preparación de las muestras e hibridación en las micromatrices

De cada grupo de plantas correspondientes a una réplica biológica se extrajo y purificó el RNA tal y como se describe en el apartado 5.2.4.1. El RNA extraído y purificado se congeló en nitrógeno líquido y se guardó a -80 °C hasta su posterior envío a la Unidad de Genómica del Centro Nacional de Biotecnología (CNB Madrid, España). El resto del proceso del RNA fue realizado por el personal de la Unidad de Genómica del CNB de Madrid (<http://www.cnb.csic.es/~genomica/>). El proceso se resume en la figura 5.7.



Figura 5.7 Esquema de los diferentes pasos del proceso de preparación de las muestras e hibridación de las mismas en las micromatrices. Extraída y adaptada de la web <http://www.cnb.csic.es/~genomica/>.

Tal y como se ha descrito antes, la primera parte del proceso la realiza el usuario. La Unidad de Genómica del CNB realiza el resto del proceso, y en primer lugar comprueban de la integridad del RNA enviado mediante el uso de un Bioanalyzer. Posteriormente se realiza la síntesis del cDNA complementario, la síntesis del RNA complementario y su posterior marcaje con biotina. Cada RNA marcado se digiere para obtener fragmentos de 35 a 200 bases de longitud y en este momento se controla la calidad de los productos de digestión. Posteriormente el RNA es hibridado en una micromatriz (en nuestro caso, ATH1) y la matriz es finalmente escaneada. La información obtenida de la imagen de escaneo de la matriz es transformada en valores numéricos según la intensidad de señal en cada pocillo de la micromatriz, los datos son sometidos al análisis bioinformático donde

se aplican los algoritmos matemáticos más adecuados y se procede a la entrega de resultados al usuario.

5.2.4.6.3. La micromatriz ATH1

La micromatriz utilizada para la hibridación es la denominada “Arabidopsis ATH1 Genome Array” de la compañía Affymetrix. Esta micromatriz fue diseñada en colaboración con el Institute for Genome Research (TIGR) y contiene unas 22500 sondas que representan aproximadamente 24000 secuencias génicas en una única micromatriz. Este tipo de micromatrices de la compañía Affymetrix se obtienen mediante la síntesis *in situ* de oligonucleótidos (específicos para cada gen) de 25-nt utilizando la técnica de fotolitografía sobre una superficie de cuarzo. Cada gen se representa por un conjunto de 11-20 sondas específicas de 25-nt diseñadas en el extremo 3' del gen de interés. A su vez, un control negativo que presenta la misma secuencia pero con una mutación puntual en posición central acompaña a cada sonda, como una estrategia de control de la especificidad de la hibridación.

5.2.4.6.4. Análisis de los datos

La corrección del ruido de fondo, la normalización y el cálculo de los niveles de expresión se realizaron utilizando el algoritmo Robust Multiarray Analysis (Irizarry y col., 2003). Seguidamente, el análisis de expresión diferencial se llevo a cabo mediante un modelo lineal bayesiano para datos de micromatrices (Limma). Para el control FDR, los valores de p se corrigieron usando el método descrito por Benjamini y Hochberg, (1995).

Los resultados proporcionados por el Servicio de Genómica del CNB se analizaron exhaustivamente mediante la utilización de criterios de filtrado de los datos basados en la variación del nivel de expresión de los genes. Para ello, se realizó una asignación arbitraria de un valor de corte respecto a la diferencia de

expresión de forma que aquellos genes que presentaban una tasa de variación $\geq 1,5$ se consideraron genes inducidos y aquellos genes que presentaban tasas de variación $\leq -1,5$ se consideraron genes reprimidos. Además, los genes se seleccionaron y ordenaron en función del p-valor ($\leq 0,001$), lo que nos permitió distinguir entre las diferencias biológicamente significativas de las muestras de estudio y las diferencias puramente debidas al azar (discriminación de falsos positivos), y del b-valor (≥ 5), que es indicativo del número de veces que un determinado gen se expresa de forma diferencial en una muestra con respecto al control.

La clasificación funcional de los genes expresados de forma diferencial en las muestras objeto de estudio se llevó a cabo mediante la clasificación por ontología génica (GO) de la base de datos de Arabidopsis (http://www.arabidopsis.org/portals/genAnnotation/functional_annotation/go.jsp) y la web FatiGo (fatigo.bionfo.cipf.es). El método de agrupamiento jerárquico en el programa Multiple Array Viewer, disponible en TIGR, se utilizó para identificar grupos de genes con un perfil de expresión génica similar en las condiciones experimentales analizadas (Saeed y col., 2006).

5.2.5. Tecnología Gateway®: vectores y transformación

La tecnología Gateway® es una herramienta de clonaje útil, rápida y versátil que la convierte en una buena alternativa a los métodos de clonaje habituales que utilizan enzimas de restricción. Esta tecnología permite clonar secuencias de DNA para hacer análisis funcional y expresión en múltiples sistemas, y su utilización está cada vez más extendida debido a sus numerosas ventajas. Por un lado es muy importante el ahorro en tiempo de experimentación, pues en sólo un día se puede obtener el vector de entrada completo en un cultivo celular; y por otro, también lo

es la versatilidad a la hora de poder generar un gran número de vectores de destino (de expresión en levaduras, plantas...) desde un mismo vector de entrada (pENTR™). Esta tecnología de clonaje se basa en las propiedades de inserción del DNA por recombinación específica del bacteriófago lambda. Y los componentes de la recombinación están modificados para mejorar la especificidad y eficiencia del sistema.

5.2.5.1. Generación del vector de entrada (pENTR™)

En ésta Tesis Doctoral se utilizó el vector pENTR™/D-TOPO (pENTR™/D-TOPO Cloning Kit, Invitrogen, Life Technologies™) para generar los vectores de entrada. El vector pENTR™/D-TOPO se caracteriza por facilitar la clonación direccional del inserto de manera rápida. Para ello los cebadores que se utilizaron para la amplificación de los fragmentos a insertar fueron diseñados especialmente para éste tipo de clonaciones. En cada caso, el cebador de sentido “forward” se diseñó añadiendo la secuencia CACC en el extremo 5', justo antes del primer codón codificante (ATG). El vector posee un extremo cohesivo de secuencia GTGG (complementaria a CACC) que es el que invade el extremo 5' del producto de PCR, hibrida con las bases añadidas y estabiliza el producto de PCR en la orientación adecuada. Debido a esto, la clonación se produce en la dirección correcta en más del 90 % de los casos. El otro extremo del vector es de carácter romo y en todos los casos el cebador de sentido “reverse” se diseñó terminando con la secuencia de terminación del gen, incluido el codón stop (TGA) o sustituyéndolo por una alanina (GCC) si el objetivo era expresarlo con un gen reportero en C-terminal como fue el caso. Las secuencias de los cebadores y las condiciones de las PCRs utilizadas para la amplificación de los genes completos se indican a continuación en la tabla 5.4.

Gen	Tm PCR	t ext (s)	Ciclos	Cebador "forward"	Cebador "reverse"
<i>GmFAD7-2</i>	72 (2 pasos)	60	35	CACCATGGCAACTTGGGTATTATCAG	GGCCTCTGATTGGACGAGCCATT
<i>GmFAD7-1</i>	70 (3 pasos)	60	40	CACCATGGCAACTTGGATATTATCAG	GGCCTCTAATTTGGAAGAGCCATTAATC
<i>AtFAD7</i>	68 (3 pasos)	60	35	CACCATGGCGAACTTGGTCTTATC	GGCATCTGCTCTTACTTTGACCTCTC
<i>AtFAD6</i>	70 (3 pasos)	60	40	CACCATGGCTTCCAGAATTGCTGATTC	GGCGGCTGTGTAGTTAGGCATTGCTTTC

Tabla 5.4 Cebadores y condiciones de PCR utilizadas en la amplificación de los fragmentos de cDNA destinados al clonaje en el vector pENTR™/D-TOPO.

Las enzimas de restricción utilizadas para la confirmación de clones positivos fueron *NotI* y *AscI* para todos los casos; en el caso de los dos genes *GmFAD7*, debido a la alta homología de los fragmentos a amplificar, se realizó una digestión previa que garantizaba la ausencia del otro amplicón; en el caso de *GmFAD7-1*, se eliminó *GmFAD7-2* mediante digestión con *BclI* y para el caso de *GmFAD7-2* se eliminó *GmFAD7-1* con *KpnI*. Para la amplificación de los fragmentos de cDNA en éstos casos se utilizó la enzima Phusion® High Fidelity DNA Polymerase de Finnzymes (Thermo Scientific).

Tras la amplificación se procedió a su ligación en el vector pENTR™/D-TOPO. Para esto se utilizaron 2 µl de PCR purificada, 1 µl de solución salina (del kit), 2,5 µl de agua estéril y 0,5 µl de vector. Se mezclaron en un tubo de PCR y se incubaron a temperatura ambiente de 5 a 30 minutos. Posteriormente se pusieron en hielo 5 minutos y se descongeló un tubo de células competentes (se usaron indistintamente las células One Shot® TOP10 provenientes del kit o células DH5α, preparadas en el laboratorio) y se añadieron 2 µl de ligación al tubo de células procediendo a su transformación tal y como está descrito en el apartado 3.2.4.5.3. El marcador selectivo utilizado en el caso de los vectores generados de éste modo fue Kanamicina (50 µg/ml). Tras la selección de clones positivos se extrajo el DNA plasmídico, tal y como se describe en el apartado 3.2.4.5.6, se comprobó la

inserción por digestión con enzimas de restricción y se mandó a secuenciar. Los vectores fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación del CNIO (Madrid) para confirmar las identidades y orientaciones de los insertos. Se comprobó mediante un alineamiento que los sitios de recombinación del vector attL1 y attL2 estaban intactos para proceder al siguiente paso. La figura 5.8 muestra un mapa del vector de entrada pENTR™/D-TOPO, así como unos esquemas de los vectores generados con los diferentes insertos.

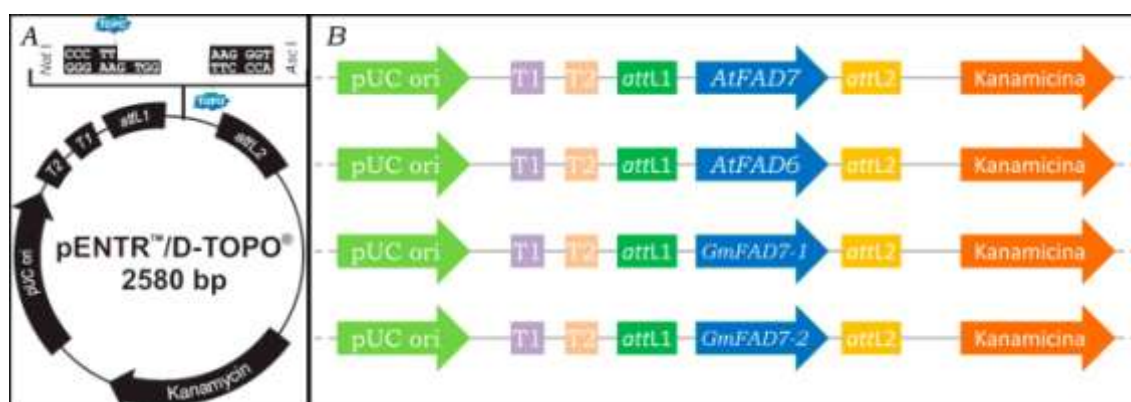


Figura 5.8 (A) Mapa del vector pENTR™/D-TOPO y (B) esquemas de las construcciones obtenidas a partir de éste vector durante ésta Tesis Doctoral.

5.2.5.2. Generación del vector de destino, reacción LR clonasa®

Los vectores con tecnología Gateway® utilizados durante ésta Tesis Doctoral poseen el gen *ccdB* en el sitio donde se introduce el inserto. El producto de éste gen es tóxico para las bacterias, lo que evita la replicación de bacterias transformadas con vectores vacíos y aumenta la eficiencia de las reacciones de ligación y recombinación que generan los vectores de entrada y destino. A pesar de ello, es frecuente que se produzca la transformación y replicación de clones con vectores vacíos. Esto fue especialmente importante en el caso particular de los vectores, de entrada y de destino, utilizados en ésta Tesis Doctoral, que poseían el mismo tipo

de resistencia (Kanamicina). De éste modo, se procedió a la digestión de 1 µg de vector de entrada con dos enzimas que no cortaban en ningún caso ninguno de los insertos; *MluI* (que corta en las posiciones 231 y 1879) y *NruI* (que corta en posición 1057), se sometió a electroforesis (apartado 3.2.4.5) y se purificó la banda superior del gel (apartado 3.2.4.5.1) que contenía el vector con los sitios de recombinación y el inserto, y en éste punto se realizó la reacción LR clonasa. El aspecto de ésta digestión en el gel de agarosa antes y después de cortar la banda superior se indica en la figura 5.9.

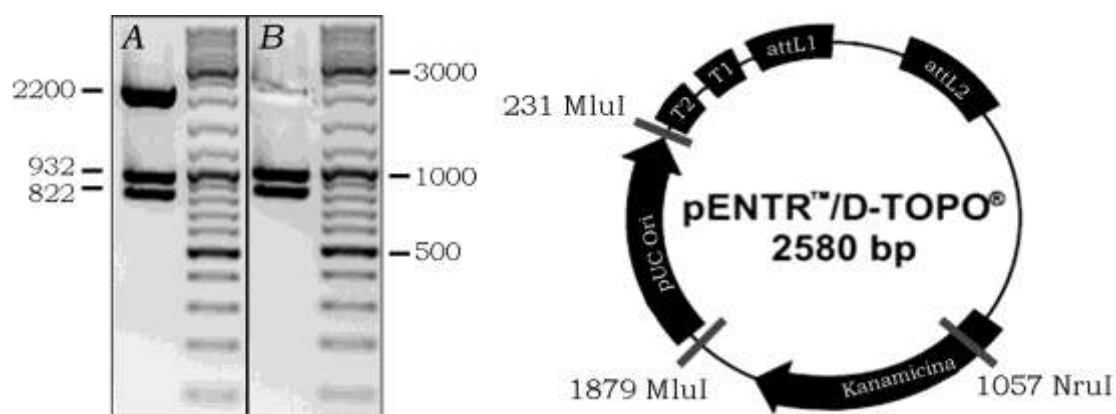


Figura 5.9 Imagen de un gel de agarosa con una digestión del vector pENTR™/D-TOPO con *MluI* y *NruI* antes (A) y después (B) de cortar la banda que fue utilizada en la reacción LR clonasa. Mapa topo con sitios de corte enzimas

Una vez digerido el vector de entrada con el inserto en la orientación adecuada se procedió a la generación del vector de destino mediante la reacción LR clonasa. Para la reacción LR clonasa se utilizó la mezcla comercial LR clonase® II Enzyme Mix (Invitrogen, Life Technologies™). Ésta contiene en cantidades adecuadas las enzimas Int (Integrasa) y Xis (Excisasa), además de un factor de integración en el huésped, que se encargan de facilitar la recombinación *in vitro* de los vectores de entrada y de destino a través de los sitios específicos attL y attR, en vectores de

entrada y destino, respectivamente; provocando el intercambio de DNA entre ellos. De éste modo, el inserto que estaba en el vector de entrada pasa a formar parte del vector de destino. La reacción LR clonasa se realizó con 25 µg de vector de entrada digerido, 50 µg de vector de destino y 1 µl de mix LR clonase II en 5 µl totales, utilizando H₂O milliQ estéril para completar el volumen y tras mezclar suavemente, se dejó a 25 °C durante 24 h. Al día siguiente se transformaron células DH5α mediante el procedimiento descrito en el apartado 3.2.4.5.3 utilizando en éste caso los 5 µl de mezcla de reacción. Tras la selección de clones positivos se extrajo el DNA plasmídico (apartado 3.2.4.5.6), se comprobó la inserción por digestión con enzimas de restricción (apartado 3.2.4.5.7) y se mandó a secuenciar. Los vectores fueron secuenciados en el Servicio de Secuenciación del CNIO (Madrid) y se comprobó que la secuencia de los insertos estaba en línea con la secuencia de los genes reporteros, que éstos se situaban en C-terminal y que poseían el mismo marco de lectura. Las enzimas de restricción utilizadas para la confirmación de clones positivos se detallan en la tabla 5.5.

Inserto	Enzima de restricción
AtFAD7	BclI
AtFAD6	AvrII
GmFAD7-1	Bsu36I
GmFAD7-2	Bsu36I

Tabla 5.5 Enzimas de restricción utilizadas para la detección de clones positivos.

Los mapas de los vectores de destino utilizados en ésta Tesis Doctoral se muestran en la figura 5.10, así como un esquema de los vectores generados con los diferentes insertos. Los vectores vacíos se replicaron en células DB3.1 debido a que

éstas están genéticamente modificadas para evitar la toxicidad del gen *ccdB* incluido en el vector vacío.

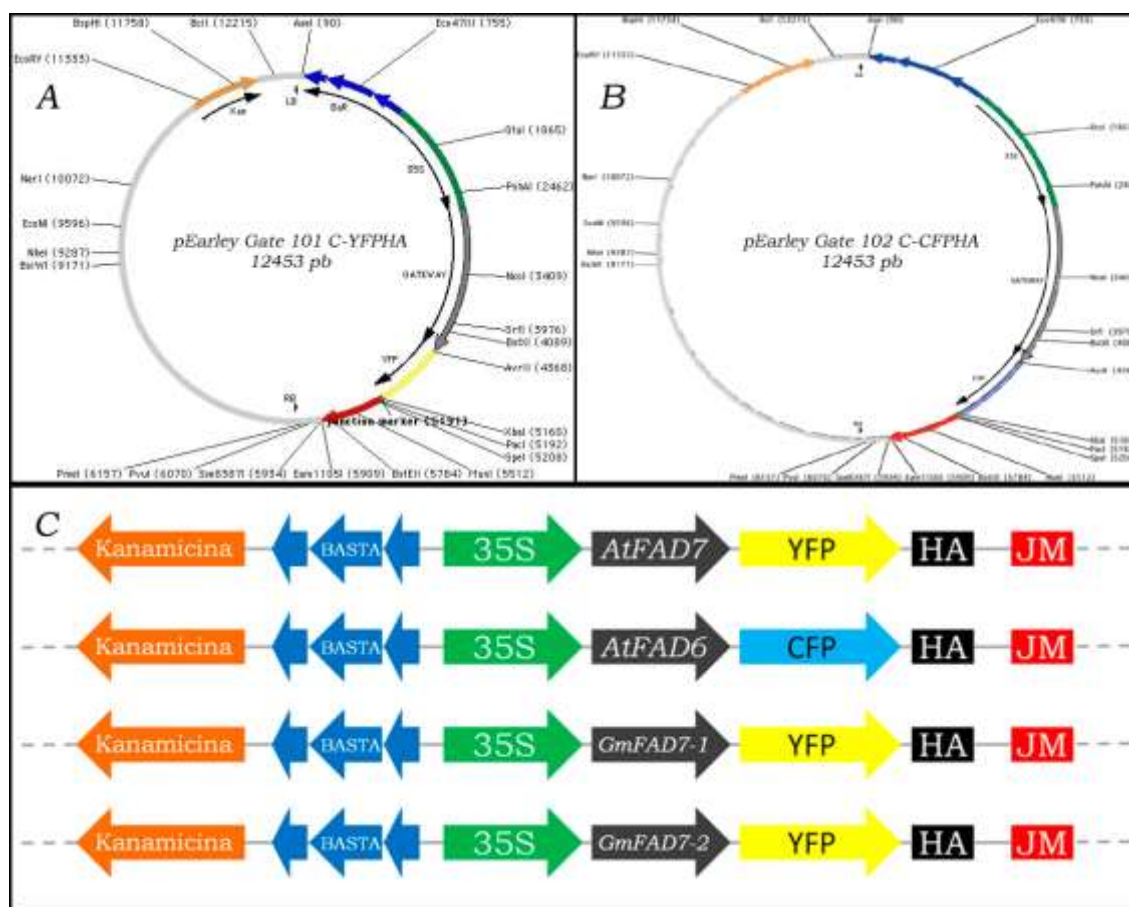


Figura 5.10 Mapas de los vectores pEarleyGate 101 (A) y 102 (B) utilizados en ésta Tesis Doctoral. (C) Esquema de las construcciones obtenidas a partir de los anteriores vectores.

5.2.5.3. Preparación de células competentes de *Agrobacterium tumefaciens*

En primer lugar se cultivaron los *Agrobacterium* en una placa de LB con resistencia a Gentamicina (25 µg/ ml) propia de la línea a 28 °C durante 2 días. De ésta placa se inocularon dos cultivos líquidos de 5 ml que se crecieron durante toda la noche, a 28 °C con agitación constante. Éste sirvió como precultivo de uno más grande de 100 ml que se creció durante 4-5 horas a 28 °C con agitación constante,

hasta que se alcanzó una densidad óptica a 550 nm de 0,5. Una vez conseguida, se transfirieron los cultivos a tubos falcon de 50 ml preenfriados y se centrifugó a 1960 g durante 15 minutos a 4 °C, centrífuga Beckmann Avanti J-20 XP (rotor JS-5.3). Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 25 ml de 1 mM HEPES pH 7,5. El material se centrifugó en las mismas condiciones durante 10 minutos. El sedimento obtenido se resuspendió en 25 ml de 1 mM HEPES y 10 % de glicerol. Este paso se repitió una segunda vez y el sedimento se resuspendió finalmente en 400 µl de 1 mM HEPES y 10 % de glicerol. Se prepararon alícuotas de 50 µl y se congelaron en nitrógeno líquido, guardándolas a -80 °C hasta su posterior utilización.

5.2.5.4. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Tras comprobar que los vectores de destino contenían el inserto en la posición adecuada, se procedió a transformar *Agrobacterium tumefaciens* mediante electroporación para la posterior infección de plantas. Para ello, se utilizaron cubetas de electroporación de 0,2 mm de paso y se descongelaron las células competentes de *Agrobacterium* (cepa GV3101 pMP90). Se añadió 1 µl de dilución 1/10 de plásmido a las células y se mezcló por pipeteo. Rápidamente se añadió la mezcla a la cubeta de electroporación y se agitó suavemente para que no quedaran burbujas. Se procedió a la electroporación con la mayor rapidez posible en el electroporador Gene Pulser II y Pulser controller plus (BioRad). Las condiciones fueron: 25 µF de capacitancia, 2,5 kV de voltaje y 400 Ω de resistencia. Se sometió la cubeta al paso de corriente produciéndose la electroporación y rápidamente se sacaron las células y se añadió 1 ml de LB frío, poniéndolas además en hielo. Éstas se cultivaron a 28 °C durante 1 h con agitación constante y posteriormente se sembraron en placa de LB con resistencia a Gentamicina (25 µg/ml; propia de la

cepa de *Agrobacterium* utilizada) y Kanamicina (50 µg/ml); propia del vector de destino insertado) y se crecieron a 30 °C durante 2 días.

La confirmación de clones positivos se realizó en éste caso mediante PCR en colonia ya que la eficiencia de extracción de DNA plasmídico de cultivos de *Agrobacterium* es muy baja debido a que cada célula sólo guarda una copia del plásmido insertado. Los cebadores utilizados para las PCR en colonia en cada construcción fueron los utilizados para realizar cada PCR inicial de amplificación del fragmento de cDNA.

5.2.5.5. Transformación de plantas de *Arabidopsis*

La transformación de plantas de *Arabidopsis* se realizó utilizando plantas de la línea silvestre ya que el objetivo era la sobreexpresión de las proteínas de interés fusionadas con un gen reportero. Para transformar las plantas se crecieron éstas en maceta hasta que desarrollaban el primer tallo. El primer paso del protocolo consistió en cortar el primer tallo al ras de la roseta, quedando las plantas listas para transformar a los 4-5 días después de ese momento. Dos días antes de la transformación se creció un cultivo de 5 ml de *Agrobacterium* transformados con el vector de destino (a 30 °C durante toda la noche con agitación constante). Al día siguiente, 2,5 ml de éste cultivo sirvieron como inóculo para uno de 50 ml que se creció en las mismas condiciones. El día de la transformación, se diluyeron los cultivos hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,8 y se centrifugaron en tubos falcon a 4250 g durante 10 minutos a 4 °C; centrífuga Beckmann Avanti J-20 XP (rotor JS-5.3). Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en una solución al 5 % de sacarosa con un 0,05 % de Silwett L-77 como surfactante para evitar la agregación de células y maximizar la superficie de interacción entre las células y la planta. Con guantes y pinceles limpios y secos, se “pintaron” las plantas de *Arabidopsis* a las que se había cortado el tallo con la solución de *Agrobacterium*,

haciendo especial hincapié en el meristemo apical, de donde surgirán los nuevos tejidos que darán lugar a los órganos reproductivos y finalmente, a las semillas. Para favorecer la infección y evitar el contacto entre plantas, se taparon las plantas con papel de film durante 7 días y posteriormente se crecieron con normalidad hasta que se recogieron las semillas (Semillas T1). Las plantas transformadas y la germinación de las semillas de posteriores generaciones se hizo en la cámara de cultivo en las mismas condiciones que las descritas en el apartado 3.1.1.3.1.

Aproximadamente 1000 semillas (T1) de cada planta transformada se crecieron en placas de medio MS con glufosinato de amonio (BASTA) 25 mg/l. Esta es la selección (en planta) correspondiente a los vectores utilizados durante ésta Tesis Doctoral. Siempre se utilizó un control positivo y uno negativo de la selección germinando semillas de fenotipo silvestre en placas de MS con y sin Glufosinato de Amonio como medio selectivo. Como se puede observar en la figura 5.11, las plantas de la línea silvestre en medio selectivo no germinaban (figura 5.11-B), y sí lo hacían las que crecían en medio no selectivo (figura 5.11-A).

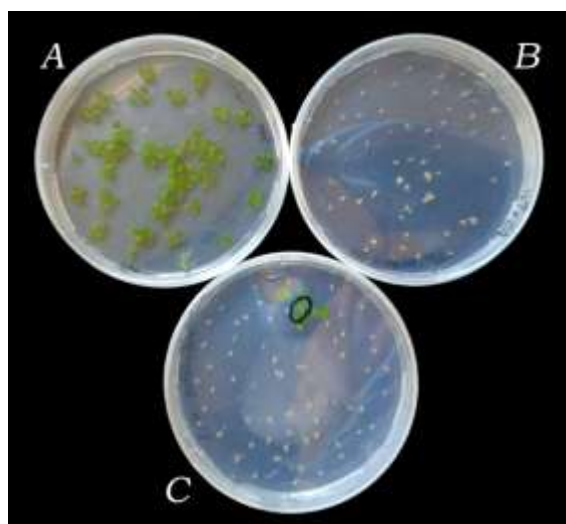


Figura 5.11 (A) Crecimiento normal de semillas de la línea silvestre en medio MS; (B) crecimiento de semillas de la línea silvestre en medio MS con BASTA y (C) crecimiento de semillas T1 en medio MS con BASTA.

Como se observa también en la figura 5.11-C, alguna semilla de las aproximadamente 1000 que se sembraron sí era resistente a la selección utilizada. De las plántulas (T1), se obtuvo una segunda generación de semillas (T2) mediante propagación. Del resto de generaciones (T2 en adelante) se germinaron de manera ordenada 100 semillas por planta de diferentes plantas por cada construcción y se calculó el porcentaje de germinación, quedándonos con los que correspondían a heterozigosis (75 %) y homozigosis (100 %) en la T2 y T3 respectivamente.

5.2.6. Técnicas de microscopía

Durante la realización de ésta Tesis Doctoral se utilizó el microscopio confocal SP2 para la visualización de los tejidos de las plantas transgénicas, que expresaban las proteínas de interés fusionadas a proteínas fluorescentes. El microscopio está localizado en el Servicio Científico Técnico de Microscopía e Imagen del IACS-Aragón y se utilizó como auto usuario tras un curso a cargo de un técnico superior.



Figura 5.11 Imagen del microscopio confocal SP2 del Servicio Científico Técnico de Microscopía e Imagen del IACS-Aragón utilizado durante esta Tesis Doctoral.

5.2.6.1. Preparación de material fresco (microscopio confocal)

Las muestras observadas en el microscopio confocal siempre procedían de material fresco. Las preparaciones se hicieron en un porta limpio sobre el que se vertió glicerol y se sumergió el tejido a visualizar (plántulas completas o cortes de hojas de roseta). Posteriormente, se taparon con un cubre evitando la formación de burbujas de aire y se sellaron con laca de uñas transparente. Cuando se hubo secado la laca, se procedió a la visualización de las muestras en el microscopio.

5.2.6.2. Microscopía confocal (SP2)

Para la toma de imágenes de las diferentes plantas transformadas, se utilizaron condiciones de visualización de las proteínas fluorescentes y los cloroplastos. Puesto que se utilizaron dos proteínas fluorescentes diferentes en los experimentos realizados durante ésta Tesis Doctoral, se establecieron dos tipos de condiciones de trabajo, unas para la proteína fluorescente amarilla (YFP) y otras para la azul (CFP). En ambos casos se utilizó la fluorescencia de la clorofila para establecer la localización de ambas señales. La longitud de onda de excitación utilizada para la YFP fue de 514 nm y la emisión se recogió de 518 a 580 nm. La longitud de onda de excitación para la CFP fue 458 nm y la emisión se recogió de 465 a 571 nm. En el caso de los cloroplastos, la clorofila se excitó con una longitud de onda de 633 nm y se recogió la señal procedente del rango 651-717 nm. Se comprobó en ambos casos que no se producía solapamiento de las señales de la proteína fluorescente y de la clorofila. Una vez establecidas las condiciones con plantas transformadas se

visualizaron muestras de plantas de fenotipo silvestre y plantas transformadas con el vector vacío, ambas como controles negativos de la fluorescencia.

5.3. *ESTADÍSTICA*

En los experimentos de expresión del capítulo 4.1 de resultados, los resultados que se muestran son de dos experimentos biológicos independientes. Los valores de las gráficas se corresponden a la media y a la desviación estadística que en el caso de las PCR semicuantitativas se corresponden a los valores corregidos según los criterios explicados en el apartado 5.2.4.4 (Análisis de los productos de PCR y cuantificación relativa). Las diferencias entre los puntos se analizaron utilizando la ANOVA de un factor, y posteriormente se hicieron comparaciones de las medias mediante el test de Duncan ($P < 0,05$). Para estos tratamientos matemáticos se utilizó el programa SPSS 19.

6. CONCLUSIONES

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abbadí, A., Domergue, F., Bauer, J., Napier, J. A. y Weltri, R.** 2004. Biosynthesis of very-long-chain polyunsaturated fatty acids in transgenic oilseeds: Constraints on their accumulation. *Plant Cell*. **16**. 2734-2748.
- Acosta, I. F. y Farmer, E. E.** 2010. Jasmonates. The American Society of Plant Biologists.
- Alfonso, M., Collados, R., Yruela, I. y Picorel, R.** 2004. Photoinhibition and recovery in a herbicide-resistant mutant from *Glycine max* (L.) Merr. cell cultures deficient in fatty acid unsaturation. *Planta*. **219**. 428-439.
- Alfonso, M., Yruela, I., Almarcegui, S., Torrado, E. y Perez, M. A.** 2001. Unusual tolerance to high temperatures in a new herbicide-resistant D1 mutant from *Glycine max* (L.) Merr. cell cultures deficient in fatty acid desaturation. *Planta*. **212**. 573-582.
- Anai, T., Yamada, T., Kinoshita, T., Rahman, S. M. y Takagi, Y.** 2005. Identification of corresponding genes for three low- α -linolenic acid mutants and elucidation of their contribution to fatty acid biosynthesis in soybean seed. *Plant sci*. **168**. 1615-1623.
- Andersson, M., Goksor, M. y Sandelius, A.** 2007. Optical manipulation reveals strong attracting forces at membrane contact sites between endoplasmic reticulum and chloroplasts. *J. Biol. Chem*. **282**. 1170-1174.
- Andersson, M., Hamberg, M., Kourtchenko, O., Brunnstrom, A. y McPhail, K.** 2006. Oxylin profiling of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana* - Formation of a novel oxo-phytodienoic acid-containing galactolipid, arabidopside E. *J. Biol. Chem*. **281**. 31528-31537.
- Andersson, M. X., Kjellberg, J. M. y Sandelius, A. S.** 2001. Chloroplast biogenesis. Regulation of lipid transport to the thylakoid in chloroplasts isolated from expanding and fully expanded leaves of pea. *Plant Phys*. **127**. 184-193.
- Andreu, V., Lagunas, B., Collados, R., Picorel, R. y Alfonso, M.** 2010. The *GmFAD7* gene family from soybean: identification of novel genes and tissue-specific conformations of the FAD7 enzyme involved in desaturase activity. *J. Exp. Bot*. **61**. 3371-84.
- Andrews, J. y Keegstra, K.** 1983. Acyl-CoA synthetase is located in the outer-membrane and acyl-CoA thioesterase in the inner membrane of pea chloroplast envelopes. *Plant Phys*. **72**. 735-740.
- Aoyama, T., Wu, Y., Carabelli, M., Sessa, G., Dong, C. H., Ruberti, I., Morelli, G. y Chua, N. H.** 1995. Ectopic expression of the *Arabidopsis* transcriptional activator Athb-1 alters leaf cell fate in tobacco. *Plant Cell*. **7**. 1773-85.
- Appleby, R. S., Safford, R. y Nichols, B. W.** 1971. Involvement of lecithin and monogalactosyl diglyceride in linoleate synthesis by green and blue-green algae. *Biochim. Biophys. Acta. Lipids and lipid metabolism*. **248**. 205-&.
- Arnon, D. I.** 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Phys*. **24**. 1-15.

- Arondel, V., Vergnolle, C., Cantrel, C. y Kader, J. C.** 2000. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant sci.* **157**. 1-12.
- Avelange-Macherel, M. H., Macherel, D., Wada, H. y Murata, N.** 1995. Site-directed mutagenesis of histidine-residues in the delta-12-acyl-lipid desaturase of *Synechocystis*. *FEBS lett.* **361**. 111-114.
- Awai, K., Marechal, E., Block, M. A., Brun, D. y Masuda, T.** 2001. Two types of MGDG synthase genes, found widely in both 16 : 3 and 18 : 3 plants, differentially mediate galactolipid syntheses in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**. 10960-10965.
- Awai, K., Xu, C., Lu, B. y Benning, C.** 2006. Lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the chloroplast. *Biochem. Soc. Trans.* **34**. 395-398.
- Bannenberg, G., Martinez, M., Hamberg, M. y Castresana, C.** 2009. Diversity of the Enzymatic Activity in the Lipoxygenase Gene Family of *Arabidopsis thaliana*. *Lipids.* **44**. 85-95.
- Bate, N. J., Sivasankar, S., Moxon, C., Riley, J. M. C. y Thompson, J. E.** 1998. Molecular characterization of an *Arabidopsis* gene encoding hydroperoxide lyase, a cytochrome P-450 that is wound inducible. *Plant Phys.* **117**. 1393-1400.
- Beaudoin, F., Michaelson, L. V., Hey, S. J., Lewis, M. J. y Shewry, P. R.** 2000. Heterologous reconstitution in yeast of the polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**. 6421-6426.
- Beisson, F., Koo, A. J. K., Ruuska, S., Schwender, J., Pollard, M., Thelen, J. J., Paddock, T., Salas, J. J., Savage, L., Milcamps, A., Mhaske, V. B., Cho, Y. y Ohlrogge, J. B.** 2003. *Arabidopsis* genes involved in acyl lipid metabolism. A 2003 census of the candidates, a study of the distribution of expressed sequence tags in organs, and a web-based database. *Plant Phys.* **132**. 681-697.
- Beisson, F., Li Beisson, Y. y Pollard, M.** 2012. Solving the puzzles of cutin and suberin polymer biosynthesis. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **15**. 329-337.
- Bell, E., Creelman, R. A. y Mullet, J. E.** 1995. A chloroplast lipoxygenase is required for wound-induced Jasmonic acid accumulation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**. 8675-8679.
- Bell, E. y Mullet, J. E.** 1993. Characterization of an *Arabidopsis*-lipoxygenase gene responsive to methyl jasmonate and wounding. *Plant Phys.* **103**. 1133-1137.
- Benjamini, Y. y Hochberg, Y.** 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological).* **57**. 289-300.
- Benning, C.** 2008. A role for lipid trafficking in chloroplast biogenesis. *Prog. Lipid Res.* **47**. 381-389.
- Benning, C.** 2009. Mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **25**. 71-91.
- Benning, C. y Ohta, H.** 2005. Three enzyme systems for galactoglycerolipid biosynthesis are coordinately regulated in plants. *J. Biol. Chem.* **280**. 2397-2400.

- Berberich, T., Harada, M., Sugawara, K., Kodama, H. y Iba, K.** 1998. Two maize genes encoding omega-3 fatty acid desaturase and their differential expression to temperature. *Plant molecular biology*. **36**. 297-306.
- Berthold, D. A., Babcock, G. T. y Yocum, C. F.** 1981. A highly resolved, oxygen-evolving photosystem-II preparation from spinach thylakoid membranes: EPR and electron transport properties. *FEBS lett.* **134**. 231-234.
- Bessoule, J. J., Testet, E. y Cassagne, C.** 1995. Synthesis of phosphatidylcholine in the chloroplast envelope after import of lysophosphatidylcholine from endoplasmic reticulum membranes. *Eur. J. Biochem.* **228**. 490-497.
- Biesgen, C. y Weiler, E. W.** 1999. Structure and regulation of *OPR1* and *OPR2*, two closely related genes encoding 12-oxophytodienoic acid-10,11-reductases from *Arabidopsis thaliana*. *Planta*. **208**. 155-165.
- Bilyeu, K. D., Palavalli, L., Sleper, D. A. y Beuselinck, P. R.** 2003. Three microsomal omega-3 fatty-acid desaturase genes contribute to soybean linolenic acid levels. *Crop Sci.* **43**. 1833-1838.
- Black, P. N. y DiRusso, C. C.** 2003. Transmembrane movement of exogenous long-chain fatty acids: Proteins, enzymes, and vectorial esterification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**. 454-+.
- Blee, E. y Joyard, J.** 1996. Envelope membranes from spinach chloroplasts are a site of metabolism of fatty acid hydroperoxides. *Plant Phys.* **110**. 445-454.
- Bligh, E. G. y Dyer, W. J.** 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Phys.* **37**. 911-7.
- Block, M. A., Dorne, A. J., Joyard, J. y Douce, R.** 1983a. The phosphatidic-acid phosphatase of the chloroplast envelope is located on the inner envelope membrane. *FEBS lett.* **164**. 111-115.
- Block, M. A., Dorne, A. J., Joyard, J. y Douce, R.** 1983b. Preparation and characterization of membrane fractions enriched in outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. 2. Biochemical characterization. *J. Biol. Chem.* **258**. 3281-3286.
- Bradford, M. M.** 1976. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**. 248-254.
- Browse, J.** 2009. Jasmonate passes muster: A receptor and targets for the defense hormone. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **60**. 183-205.
- Browse, J., Hugly, S., Miquel, M. y Somerville, C.** 1991. Elucidating lipid metabolism using mutants of *Arabidopsis* *Plant Molecular Biology* **212**. 707-718.
- Browse, J., Kunst, L., Anderson, S., Hugly, S. y Somerville, C.** 1989. A mutant of *Arabidopsis* deficient in the chloroplast 16:1/18:1 desaturase. *Plant Phys.* **90**. 522-529.
- Browse, J., McCourt, P. y Somerville, C.** 1986a. A mutant of *Arabidopsis* deficient in C(18:3) and C(16:3) leaf lipids. *Plant Phys.* **81**. 859-64.
- Browse, J., McCourt, P. y Somerville, C. R.** 1985. A mutant of *Arabidopsis* lacking a chloroplast-specific lipid. *Science*. **227**. 763-765.

- Browse, J., Roughan, P. G. y Slack, C. R.** 1981. Light control of fatty acid synthesis and diurnal fluctuations of fatty acid composition in leaves. *Biochem. J.* **196**. 347-354.
- Browse, J., Warwick, N., Somerville, C. R. y Slack, C. R.** 1986b. Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid syntehsis in the 16:3 plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* **235**. 25-31.
- Browse, J. A. y Slack, C. R.** 1981. Catalase stimulates linoleate desaturase activity in microsomes from developing linseed cotyledons. *FEBS lett.* **131**. 111-114.
- Buhot, N., Douliez, J. P., Jacquemard, A., Marion, D. y Tran, V.** 2001. A lipid transfer protein binds to a receptor involved in the control of plant defence responses. *FEBS lett.* **509**. 27-30.
- Burch Smith, T., Brunkard, J., Choi, Y. y Zambryski, P.** 2011. Organelle-nucleus cross-talk regulates plant intercellular communication via plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**. E1451-E1460.
- Burgos, A., Szymanski, J., Seiwert, B., Degenkolbe, T. y Hannah, M.** 2011. Analysis of short-term changes in the *Arabidopsis thaliana* glycerolipidome in response to temperature and light. *Plant J.* **66**. 656-668.
- Cahoon, E. B., Cranmer, A. M., Shanklin, J. y Ohlrogge, J. B.** 1994. Delta (6) hexadecenoic acid is synthesized by the activity of a soluble delta (6) palmitoyl-acyl carrier protein desaturase in *Thunbergia-alata* endosperm. *J. Biol. Chem.* **269**. 27519-27526.
- Cahoon, E. B., Lindqvist, Y., Schneider, G. y Shanklin, J.** 1997. Redesign of soluble fatty acid desaturases from plants for altered substrate specificity and double bond position. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**. 4872-4877.
- Cahoon, E. B. y Ohlrogge, J. B.** 1994. Metabolic evidence for the involvement of a delta (4)-palmitoyl-acyl carrier protein desaturase in petroselinic acid synthesis in Coriander endosperm and transgenic tobacco cells. *Plant Phys.* **104**. 827-837.
- Cahoon, E. B., Shanklin, J. y Ohlrogge, J. B.** 1992. Expression of a Coriander desaturase results in petroselinic acid production in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**. 11184-11188.
- Carlsson, A.** 2009. Plant oils as feedstock alternatives to petroleum - A short survey of potential oil crop platforms. *Biochimie.* **91**. 665-670.
- Carvalho, A. D., Teodoro, C. E. D., Da Cunha, M., Okorokova Facanha, A. L. y Okorokov, L. A.** 2004. Intracellular localization of a lipid transfer protein in *Vigna unguiculata* seeds. *Physiol. Plant.* **122**. 328-336.
- Castillo, M. C., Martinez, C., Buchala, A., Metraux, J. P. y Leon, J.** 2004. Gene-specific involvement of beta-oxidation in wound-activated responses in *Arabidopsis*. *Plant Phys.* **135**. 85-94.
- Cline, K. y Keegstra, K.** 1983. Galactosyltransferases involved in galactolipid biosynthesis are located in the outer membrane of pea chloroplast envelopes. *Plant Phys.* **71**. 366-372.
- Collados, R., Andreu, V., Picorel, R. y Alfonso, M.** 2006. A light-sensitive mechanism differently regulates transcription and transcript stability of omega-3 fatty acid desaturases (*FAD3*, *FAD7* and *FAD8*) in soybean photosynthetic cell suspensions. *FEBS lett.* **580**. 4934-40.
- Coulon, D., Faure, L., Salmon, M., Wattelet, V. y Bessoule, J.-J.** 2012. Occurrence, biosynthesis and functions of N-acylphosphatidylethanolamines

(NAPE): Not just precursors of N-acyl ethanolamines (NAE). *Biochimie*. **94**. 75-85.

Chae, K., Kieslich, C., Morikis, D., Kim, S.-C. y Lord, E. 2009. A gain-of-function mutation of Arabidopsis lipid transfer protein 5 disturbs pollen tube tip growth and fertilization. *Plant Cell*. **21**. 3902-3914.

Chandra, S., Heinsteins, P. F. y Low, P. S. 1996. Activation of phospholipase a by plant defense elicitors. *Plant Phys*. **110**. 979-986.

Chapman, K. y Ohlrogge, J. 2012. Compartmentation of triacylglycerol accumulation in plants. *J. Biol. Chem*. **287**. 2288-94.

Chehab, E. W., Kim, S., Savchenko, T., Kliebenstein, D. y Dehesh, K. 2011. Intronic T-DNA insertion renders Arabidopsis *opr3* a conditional jasmonic acid-producing mutant. *Plant Phys*. **156**. 770-778.

Chen, W., Yu, X.-H., Zhang, K., Shi, J. y De Oliveira, S. 2011. *Male sterile 2* encodes a plastid-localized fatty acyl carrier protein reductase required for pollen exine development in Arabidopsis. *Plant Phys*. **157**. 842-853.

Chi, X., Yang, Q., Lu, Y., Wang, J. y Zhang, Q. 2011. Genome-Wide analysis of fatty acid desaturases in Soybean (*Glycine max*). *Plant Mol. Biol. Rep*. **29**. 769-783.

Chini, A., Fonseca, S., Fernandez, G., Adie, B. y Chico, J. M. 2007. The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*. **448**. 666-U4.

Chung, H., Gao, X., Jayanty, S. y Thines, B. 2008. Regulation and function of Arabidopsis JASMONATE ZIM-domain genes in response to wounding and herbivory. *Plant Phys*. **146**. 952-964.

Darwish, E., Testerink, C., Khalil, M., El Shihy, O. y Munnik, T. 2009. Phospholipid signaling responses in salt-stressed rice leaves. *Plant & Cell Physiology*. **50**. 986-997.

Das, T., Thurmond, J. M., Bobik, E., Leonard, A. E. y Parker Barnes, J. M. 2000. Polyunsaturated fatty acid-specific elongation enzymes. *Biochem. Soc. Trans*. **28**. 658-660.

DeBono, A., Yeats, T., Bird, D. y Jetter, R. 2009. Arabidopsis LTPG is a glycosylphosphatidylinositol-anchored lipid transfer protein required for export of lipids to the plant surface. *Plant Cell*. **21**. 1230-1238.

Delker, C., Stenzel, I., Hause, B., Miersch, O. y Feussner, I. 2006. Jasmonate biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* - Enzymes, products, regulation. *Plant biology*. **8**. 297-306.

Dhaubhadel, S., Browning, K. S., Gallie, D. R. y Krishna, P. 2002. Brassinosteroid functions to protect the translational machinery and heat-shock protein synthesis following thermal stress. *Plant J*. **29**. 681-691.

Dhaubhadel, S., Chaudhary, S., Dobinson, K. F. y Krishna, P. 1999. Treatment with 24-epibrassinolide, a brassinosteroid, increases the basic thermotolerance of *Brassica napus* and tomato seedlings. *Plant molecular biology*. **40**. 333-342.

Divi, U., Rahman, T. y Krishna, P. 2010. Brassinosteroid-mediated stress tolerance in Arabidopsis shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biol*. **10**. 151.

Diz, M., Carvalho, A., Da Cunha, M. y Beltramini, L. 2011. Characterisation, immunolocalisation and antifungal activity of a lipid

transfer protein from chili pepper (*Capsicum annuum*) seeds with novel alpha-amylase inhibitory properties. *Physiol. Plant.* **142**. 233-246.

Domergue, F., Lerchl, J., Zahringer, U. y Heinz, E. 2002. Cloning and functional characterization of Phaeodactylum tricornutum front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **269**. 4105-4113.

Dörmann, P. 2005. Membrane lipids. D. J. Murphy. Plants Lipids-Biology, Utilisation and Manipulation. Blackwell Publishing. 123-161.

Dörmann, P. y Benning, C. 2002. Galactolipids rule in seed plants. *Trends in plant science.* **7**. 112-118.

Dörmann, P., Hoffmann-Benning, S., Balbo, I. y Benning, C. 1995. Isolation and characterization of an Arabidopsis mutant deficient in the thylakoid lipid digalactosyl diacylglycerol. *Plant Cell.* **7**. 1801-1810.

Dorne, A. J. y Heinz, E. 1989. Position and pairing of fatty acids in phosphatidylglycerol from Pea leaf chloroplasts and mitochondria. *Plant sci.* **60**. 39-46.

Douce, R. 1974. Site of biosynthesis of galactolipids in spinach chloroplasts. *Science.* **183**. 852-853.

Douce, R. y Joyard, J. 1981. Does the plastid envelope derive from the endoplasmic reticulum? *Trends in biochemical sciences.* **6**. 237-239.

Dubacq, J. P. y Tremolieres, A. 1983. Occurrence and function of phosphatidylglycerol containing delta-3-trans-hexadecenoic acid in photosynthetic lamellae. *Physiologie végétale.* **21**. 293-312.

Dubots, E., Botte, C., Boudiere, L., Yamaryo Botte, Y. y Jouhet, J. 2012. Role of phosphatidic acid in plant galactolipid synthesis. *Biochimie.* **94**. 86-93.

Durrett, T., Benning, C. y Ohlrogge, J. 2008. Plant triacylglycerols as feedstocks for the production of biofuels. *Plant J.* **54**. 593-607.

Dyer, J. M., Chapital, D. C., Kuan, J. C. W., Mullen, R. T. y Turner, C. 2002. Molecular analysis of a bifunctional fatty acid conjugase/desaturase from tung. Implications for the evolution of plant fatty acid diversity. *Plant Phys.* **130**. 2027-2038.

Dyer, J. M. y Mullen, R. T. 2001. Immunocytological localization of two plant fatty acid desaturases in the endoplasmic reticulum. *FEBS lett.* **494**. 44-47.

Dyer, J. M., Stymne, S., Green, A. G. y Carlsson, A. S. 2008. High-value oils from plants. *The Plant Journal.* **54**. 640-655.

Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K. y Juehne, T. 2006. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J.* **45**. 616-629.

Edwards, K., Johnstone, C. y Thompson, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* **19**. 1349-1349.

Ekman, A., Bulow, L. y Stymne, S. 2007. Elevated atmospheric CO₂ concentration and diurnal cycle induce changes in lipid composition in Arabidopsis thaliana. *New Phytol.* **174**. 591-599.

Ellinger, D., Stingl, N., Kubigsteltig, I., Bals, T. y Juenger, M. 2010. DONGLE and DEFECTIVE IN ANTHR DEHISCENCE1 lipases are not essential for wound- and pathogen-induced jasmonate biosynthesis:

redundant lipases contribute to jasmonate formation. *Plant Phys.* **153**. 114-127.

Fernandez Calvo, P., Chini, A., Fernandez Barbero, G., Chico, J.-M. y Gimenez Ibanez, S. 2011. The Arabidopsis bHLH transcription factors MYC3 and MYC4 are targets of JAZ repressors and act additively with MYC2 in the activation of jasmonate responses. *Plant Cell*. **23**. 701-715.

Ferro, M., Brugière, S., Salvi, D., Seigneurin-Berny, D., Court, M., Moyet, L., Ramus, C., Miras, S., Mellal, M., Le Gall, S., Kieffer-Jaquinod, S., Bruley, C., Garin, J., Joyard, J., Masselon, C. y Rolland, N. 2010. AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. *Molecular & cellular proteomics*. **9**. 1063-1084.

Ferro, M., Salvi, D., Brugiere, S., Miras, S. y Kowalski, S. 2003. Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Molecular & cellular proteomics*. **2**. 325-345.

Feussner y Wasternack, C. 2002. The lipoxygenase pathway. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **53**. 275-297.

Footitt, S., Slocombe, S. P., Larner, V., Kurup, S. y Wu, Y. S. 2002. Control of germination and lipid mobilization by COMATOSE, the Arabidopsis homologue of human ALDP. *EMBO J.* **21**. 2912-2922.

Fox, B. G., Shanklin, J., Somerville, C. y Munck, E. 1993. Stearoyl-acyl carrier protein delta-9 desaturase from *Ricinus communis* is a diiron-oxo protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**. 2486-2490.

Frentzen, M. 2004. Phosphatidylglycerol and sulfoquinovosyldiacylglycerol: anionic membrane lipids and phosphate regulation. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **7**. 270-276.

Froehlich, J. E., Benning, C. y Dormann, P. 2001a. The digalactosyldiacylglycerol (DGDG) synthase DGD1 is inserted into the outer envelope membrane of chloroplasts in a manner independent of the general import pathway and does not depend on direct interaction with monogalactosyldiacylglycerol synthase for DGDG biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **276**. 31806-31812.

Froehlich, J. E., Itoh, A. y Howe, G. A. 2001b. Tomato allene oxide synthase and fatty acid hydroperoxide lyase, two cytochrome P450s involved in oxylipin metabolism, are targeted to different membranes of chloroplast envelope. *Plant Phys.* **125**. 306-317.

Froehlich, J. E., Wilkerson, C. G., Ray, W. K., McAndrew, R. S. y Osteryoung, K. W. 2003. Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis. *Journal of proteome research*. **2**. 413-425.

Fukuchi Mizutani, M., Tasaka, Y., Tanaka, Y., Ashikari, T. y Kusumi, T. 1998. Characterization of Delta 9 acyl-lipid desaturase homologues from *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology*. **39**. 247-253.

Gao, J., Ajjawi, I., Manoli, A., Sawin, A. y Xu, C. 2009. FATTY ACID DESATURASE4 of Arabidopsis encodes a protein distinct from characterized fatty acid desaturases. *Plant J.* **60**. 832-839.

Garcia Soto, C., Vazquez Cuervo, J., Clemente Colon, P. y Hernandez, F. 2012. Satellite oceanography and climate change. *Deep-sea research. Part 2, Topical studies in oceanography*. **77-80**. 1-9.

- Gardiner, S. E., Heinz, E. y Roughan, P. G.** 1984. Rates and products of long-chain fatty-acid synthesis from [1-C-14]-labeled acetate in chloroplasts isolated from leaves of 16:3 and 18:3 plants. *Plant Phys.* **74**. 890-896.
- Gardiner, S. E., Roughan, P. G. y Slack, C. R.** 1982. Manipulating the incorporation of [1-C-14]-labeled acetate into different leaf glycerolipids in several plant species. *Plant Phys.* **70**. 1316-1320.
- Gibson, S., Arondel, V., Iba, K. y Somerville, C.** 1994. Cloning of a temperature-regulated gene encoding a chloroplast omega-3 desaturase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Phys.* **106**. 1615-21.
- Glauser, G., Dubugnon, L., Rudaz, S. y Wolfender, J.-L.** 2009. Velocity estimates for signal propagation leading to systemic jasmonic acid accumulation in wounded *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.* **284**. 34506-34513.
- Glauser, G., Grata, E., Rudaz, S. y Wolfender, J.-L.** 2008. High-resolution profiling of oxylipin-containing galactolipids in *Arabidopsis* extracts by ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*. **22**. 3154-3160.
- Graboski, M. S. y McCormick, R. L.** 1998. Combustion of fat and vegetable oil derived fuels in diesel engines. *Progress in energy and combustion science*. **24**. 125-164.
- Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M. y Zouni, A.** 2009. Cyanobacterial photosystem II at 2.9-angstrom resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**. 334-342.
- Guy, J. E., Whittle, E., Moche, M., Lengqvist, J., Lindqvist, Y. y Shanklin, J.** 2011. Remote control of regioselectivity in acyl-acyl carrier protein-desaturases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **108**. 16594-16599.
- Hamada, T., Kodama, H., Takeshita, K., Utsumi, H. y Iba, K.** 1998. Characterization of transgenic tobacco with an increased alpha-linolenic acid level. *Plant Phys.* **118**. 591-598.
- Hamberg, M., Sanz, A. y Castresana, C.** 1999. Alpha-oxidation of fatty acids in higher plants - Identification of a pathogen-inducible oxygenase (PIOX) as an alpha-dioxygenase and biosynthesis of 2-hydroperoxylinolenic acid. *J. Biol. Chem.* **274**. 24503-24513.
- Harms, K., Atzorn, R., Brash, A., Kuhn, H. y Wasternack, C.** 1995. Expression of a flax allene oxide synthase cDNA leads to increased endogenous jasmonic acid (JA) levels in transgenic potato plants but not to a corresponding activation of a JA-responding genes. *Plant Cell*. **7**. 1645-1654.
- Harris, J., Hrmova, M., Lopato, S. y Langridge, P.** 2011. Modulation of plant growth by HD-Zip class I and II transcription factors in response to environmental stimuli. *New Phytol.* **190**. 823-37.
- Harwood, J. L.** 1988. Fatty acid metabolism. *Annu. Rev. Plant. Phys.* **39**. 101-138.
- Haswell, E. S. y Meyerowitz, E. M.** 2006. MscS-like proteins control plastid size and shape in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* **16**. 1-11.
- Hayashi, M., Nito, K., Takei Hoshi, R., Yagi, M. y Kondo, M.** 2002. Ped3p is a peroxisomal ATP-binding cassette transporter that might supply substrates for fatty acid beta-oxidation. *Plant & Cell Physiology*. **43**. 1-11.
- He, W., King, A., Khan, M. A., Cuevas, J. y Ramiarmanana, D.** 2011. Analysis of seed phorbol-ester and curcumin content together with genetic

diversity in multiple provenances of *Jatropha curcas* L. from Madagascar and Mexico. *Plant Physiol. Biochem.* **49**. 1183-1190.

He, Y. H., Fukushige, H., Hildebrand, D. F. y Gan, S. S. 2002. Evidence supporting a role of jasmonic acid in Arabidopsis leaf senescence. *Plant Phys.* **128**. 876-884.

Heilmann, I. 2009. Using genetic tools to understand plant phosphoinositide signalling. *Trends in plant science.* **14**. 171-179.

Heilmann, I., Mekhedov, S., King, B., Browse, J. y Shanklin, J. 2004a. Identification of the Arabidopsis palmitoyl-monogalactosyldiacylglycerol delta7-desaturase gene FAD5, and effects of plastidial retargeting of Arabidopsis desaturases on the fad5 mutant phenotype. *Plant Phys.* **136**. 4237-45.

Heilmann, I., Pidkowich, M. S., Girke, T. y Shanklin, J. 2004b. Switching desaturase enzyme specificity by alternate subcellular targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**. 10266-10271.

Heinz, E. y Roughan, P. G. 1983. Similarities and differences in lipid-metabolism of chloroplasts isolated from 18:3 and 16:3 plants. *Plant Phys.* **72**. 273-279.

Heppard, E. P., Kinney, A. J., Stecca, K. L. y Miao, G. H. 1996. Developmental and growth temperature regulation of two different microsomal omega-6 desaturase genes in soybeans. *Plant Phys.* **110**. 311-9.

Holzl, G., Witt, S., Kelly, A. A., Zahringer, U. y Warnecke, D. 2006. Functional differences between galactolipids and glucolipids revealed in photosynthesis of higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**. 7512-7517.

Hollenbach, B., Schreiber, L., Hartung, W. y Dietz, K. J. 1997. Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly. *Planta.* **203**. 9-19.

Hong, Y., Zhang, W. y Wang, X. 2010. Phospholipase D and phosphatidic acid signalling in plant response to drought and salinity. *Plant, cell and environment.* **33**. 627-635.

Horiguchi, G., Fuse, T., Kawakami, N., Kodama, H. y Iba, K. 2000. Temperature-dependent translational regulation of the ER omega-3 fatty acid desaturase gene in wheat root tips. *Plant J.* **24**. 805-813.

Horiguchi, G., Iwakawa, H., Kodama, H., Kawakami, N. y Nishimura, M. 1996a. Expression of a gene for plastid omega-3 fatty acid desaturase and changes in lipid and fatty acid compositions in light- and dark-grown wheat leaves. *Physiol. Plant.* **96**. 275-283.

Horiguchi, G., Kawakami, N., Kusumi, K., Kodama, H. y Iba, K. 1998. Developmental regulation of genes for microsome and plastid omega-3 fatty acid desaturases in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Physiol.* **39**. 540-544.

Horiguchi, G., Kodama, H., Nishimura, M. y Iba, K. 1996b. Role of omega-3 fatty acid desaturases in the regulation of the level of trienoic fatty acids during leaf cell maturation. *Planta.* **199**. 439-442.

Hu, Q., Sommerfeld, M., Jarvis, E., Ghirardi, M. y Posewitz, M. 2008. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. *Plant J.* **54**. 621-639.

- Hugly, S., Kunst, L., Browse, J. y Somerville, C.** 1989. Enhanced thermal tolerance of photosynthesis and altered chloroplast ultrastructure in a mutant of *Arabidopsis* deficient in lipid desaturation. *Plant Phys.* **90**. 1134-42.
- Hugly, S. y Somerville, C.** 1992. A role for membrane lipid polyunsaturation in chloroplast biogenesis at low temperature. *Plant Phys.* **99**. 197-202.
- Hyun, Y., Choi, S., Hwang, H.-J., Yu, J. y Nam, S.-J.** 2008. Cooperation and functional diversification of two closely related galactolipase genes for jasmonate biosynthesis. *Dev. Cell.* **14**. 183-192.
- Iba, K.** 2002. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **53**. 225-45.
- Imbusch, R. y Mueller, M. J.** 2000. Analysis of oxidative stress and wound-inducible dinor isoprostanes F-1 (phytoprostanes F-1) in plants. *Plant Phys.* **124**. 1293-1303.
- Irizarry, R. A., Hobbs, B., Collin, F., Beazer-Barclay, Y. D., Antonellis, K. J., Scherf, U. y Speed, T. P.** 2003. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics.* **4**. 249-264.
- Ishiguro, S., Kawai Oda, A., Ueda, J., Nishida, I. y Okada, K.** 2001. The DEFECTIVE IN ANTHR DEHISCENCE1 gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* **13**. 2191-2209.
- Itoh, A. y Howe, G. A.** 2001. Molecular cloning of a divinyl ether synthase - Identification as a CYP74 cytochrome P-450. *J. Biol. Chem.* **276**. 3620-3627.
- Jarvis, P., Dormann, P., Peto, C. A., Lutes, J. y Benning, C.** 2000. Galactolipid deficiency and abnormal chloroplast development in the *Arabidopsis* MGD synthase 1 mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**. 8175-8179.
- Jones, M.** 2007. Lipids in photosynthetic reaction centres: Structural roles and functional holes. *Prog. Lipid Res.* **46**. 56-87.
- Joyard, J. y Douce, R.** 1977. Site of synthesis of phosphatidic acid and diacylglycerol in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta. Lipids and lipid metabolism.* **486**. 273-285.
- Joyard, J. y Stumpf, P. K.** 1981. SYNTHESIS OF LONG-CHAIN ACYL-COA IN CHLOROPLAST ENVELOPE MEMBRANES. *Plant Phys.* **67**. 250-256.
- Kader, J. C.** 1985. Lipid binding proteins in plants. *Chem. Phys. Lipids.* **38**. 51-62.
- Kagale, S., Divi, U., Krochko, J., Keller, W. y Krishna, P.** 2006. Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta.* **225**. 353-364.
- Kamp, F. y Hamilton, J.** 2006. How fatty acids of different chain length enter and leave cells by free diffusion. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids.* **75**. 149-159.
- Kazachkov, M., Chen, Q., Wang, L. y Zou, J.** 2008. Substrate preferences of a lysophosphatidylcholine acyltransferase highlight its role in phospholipid remodeling. *Lipids.* **43**. 895-902.

- Kilaru, A., Blancaflor, F., Venables, B., Tripathy, S. y Mysore, K.** 2007. The N-acyl ethanolamine-mediated regulatory pathway in plants. *Chem. Biodivers.* **4**. 1933-1955.
- Klopfenstein, W. E. y Shigley, J. W.** 1967. Changes in fatty acid composition of sulfolipid and phospholipids during maturation of alfalfa. *J. Lipid Res.* **8**. 350-1.
- Kodama, H., Hamada, T., Horiguchi, G., Nishimura, M. y Iba, K.** 1994. Genetic enhancement of cold tolerance by expression of a gene for chloroplast omega-3-fatty-acid desaturase in transgenic tobacco. *Plant Phys.* **105**. 601-605.
- Kodama, H., Horiguchi, G., Nishiuchi, T., Nishimura, M. y Iba, K.** 1995. Fatty acid desaturation during chilling acclimation is one of the factors involved in conferring low temperature tolerance to young tobacco leaves. *Plant Phys.* **107**. 1177-1185.
- Koiwai, A., Matsuzaki, T., Suzuki, F. y Kawashima, N.** 1981. Changes in total and polar lipids and their fatty acid composition in Tobacco leaves during growth and senescence. *Plant Cell Physiol.* **22**. 1059-1065.
- Koo, A. J. K., Chung, H., Kobayashi, Y. y Howe, G.** 2006. Identification of a peroxisomal acyl-activating enzyme involved in the biosynthesis of jasmonic acid in Arabidopsis. *J. Biol. Chem.* **281**. 33511-33520.
- Kourtchenko, O., Andersson, M., Hamberg, M., Brunnstrom, A. y Goebel, C.** 2007. Oxo-phytodienoic acid-containing galactolipids in Arabidopsis: Jasmonate signaling dependence. *Plant Phys.* **145**. 1658-1669.
- Kramell, R., Miersch, O., Atzorn, R., Parthier, B. y Wasternack, C.** 2000. Octadecanoid-derived alteration of gene expression and the "Oxylipin signature" in stressed barley leaves. Implications for different signaling pathways. *Plant Phys.* **123**. 177-187.
- Krishna, P.** 2003. Brassinosteroid-mediated stress responses. *J. Plant Growth Regul.* **22**. 289-297.
- Kroll, D., Meierhoff, K., Bechtold, N., Kinoshita, M. y Westphal, S.** 2001. VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**. 4238-4242.
- Kuhn, H., Wiesner, R., Rathmann, J. y Schewe, T.** 1991. Formation of ketodienoic fatty acids by the pure pea lipoxygenase-1. *Eicosanoids.* **4**. 9-14.
- Kumar, R., Tran, L.-S. P., Neelakandan, A. K. y Nguyen, H. T.** 2012. Higher plant cytochrome b5 polypeptides modulate fatty acid desaturation. *PLoS ONE.* **7**. e31370.
- Kunst, L., Browse, J. y Somerville, C.** 1989a. Enhanced thermal tolerance in a mutant of Arabidopsis deficient in palmitic acid unsaturation. *Plant Phys.* **91**. 401-8.
- Kunst, L., Browse, J. y Somerville, C.** 1989b. A mutant of Arabidopsis deficient in desaturation of palmitic acid in leaf lipids. *Plant Phys.* **90**. 943-7.
- Laudert, D., Pfannschmidt, U., Lottspeich, F., Hollander-Czytko, H. y Weiler, E. W.** 1996. Cloning, molecular and functional characterization of *Arabidopsis thaliana* allene oxide synthase (CYP 74), the first enzyme of the octadecanoid pathway to jasmonates. *Plant molecular biology.* **31**. 323-335.
- Laudert, D., Schaller, F. y Weiler, E. W.** 2000. Transgenic *Nicotiana tabacum* and *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing allene oxide synthase. *Planta.* **211**. 163-165.

- Leech, R. M., Rumsby, M. G. y Thomson, W. W.** 1973. Plastid differentiation, acyl lipid, and fatty acid changes in developing green maize leaves. *Plant Phys.* **52**. 240-5.
- Lemieux, B., Miquel, M., Somerville, C. y Browse, J.** 1990. Mutants of *Arabidopsis* with alterations in seed lipid fatty acid composition. *Theoretical and applied genetics*. **80**. 234-240.
- Li Beisson, Y., Shorrosh, B., Beisson, F., Andersson, M., Arondel, V., Bates, P., Baud, S., Bird, D., Debono, A., Durrett, T., Franke, R., Graham, I., Katayama, K., Kelly, A., Larson, T., Markham, J., Miquel, M., Molina, I., Nishida, I., Rowland, O., Samuels, L., Schmid, K., Wada, H., Welti, R., Xu, C., Zallot, R. y Ohlrogge, J.** 2010. Acyl-lipid metabolism. *The arabidopsis book*. **8**. e0133.
- Lindqvist, Y., Huang, W. J., Schneider, G. y Shanklin, J.** 1996. Crystal structure of Delta(9) stearoyl-acyl carrier protein desaturase from castor seed and its relationship to other di-iron proteins. *EMBO J.* **15**. 4081-4092.
- López, M., Vicente, J., Kulasekaran, S., Vellosillo, T. y Martinez, M.** 2011. Antagonistic role of 9-lipoxygenase-derived oxylipins and ethylene in the control of oxidative stress, lipid peroxidation and plant defence. *Plant J.* **67**. 447-458.
- Lu, B., Xu, C., Awai, K., Jones, A. D. y Benning, C.** 2007. A small ATPase protein of *Arabidopsis*, TGD3, involved in chloroplast lipid import. *J. Biol. Chem.* **282**. 35945-35953.
- Maatta, S., Scheu, B., Roth, M. R., Tamura, P., Li, M., Williams, T. D., Wang, X. y Welti, R.** 2012. Levels of *Arabidopsis thaliana* leaf phosphatidic acids, phosphatidylserines, and most trienoate-containing polar lipid molecular species increase during the dark period of the diurnal cycle. *Frontiers in Plant Science*. **3**.
- MacCarthy, J. J. y Stumpf, P. K.** 1980. Effect of different temperatures on fatty acid synthesis and polyunsaturation in cell suspension cultures. *Planta*. **147**. 389-395.
- Maple, J. y Moller, S.** 2007. Interdependency of formation and localisation of the Min complex controls symmetric plastid division. *J. Cell Sci.* **120**. 3446-3456.
- Margulis, L.** 1996. Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: Phylogenetic classification of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**. 1071-1076.
- Martin, B. A., Horn, M. E., Widholm, J. M. y Rinne, R. W.** 1984. Synthesis, composition and location of glycerolipids in photoautotrophic soybean cell cultures. *Biochim. Biophys. Acta. Lipids and lipid metabolism*. **796**. 146-154.
- Martinez Rivas, J. M., Sperling, P., Luhs, W. y Heinz, E.** 2001. Spatial and temporal regulation of three different microsomal oleate desaturase genes (*FAD2*) from normal-type and high-oleic varieties of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Mol. Breed.* **8**. 159-168.
- Matsuda, O., Sakamoto, H., Hashimoto, T. y Iba, K.** 2005. A temperature-sensitive mechanism that regulates post-translational stability of a plastidial omega-3 fatty acid desaturase (*FAD8*) in *Arabidopsis* leaf tissues. *J. Biol. Chem.* **280**. 3597-604.

- Matsuda, O., Watanabe, C. y Iba, K.** 2001. Hormonal regulation of tissue-specific ectopic expression of an Arabidopsis endoplasmic reticulum-type omega-3 fatty acid desaturase (*FAD3*) gene. *Planta*. **213**. 833-840.
- Matsui, K., Wilkinson, J., Hiatt, B., Knauf, V. y Kajiwar, T.** 1999. Molecular cloning and expression of Arabidopsis fatty acid hydroperoxide lyase. *Plant & Cell Physiology*. **40**. 477-481.
- Mattoo, A. K., Hoffmanfalk, H., Edelman, M., Hoffman Falk, H. y Marder, J. B.** 1984. Regulation of protein metabolism: Coupling of photosynthetic electron transport to *in vivo* degradation of the rapidly metabolized 32-kilodalton protein of the chloroplast membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **81**. 1380-4.
- Maucher, H., Hause, B., Feussner, I., Ziegler, J. y Wasternack, C.** 2000. Allene oxide synthases of barley (*Hordeum vulgare* cv. Salome): tissue specific regulation in seedling development. *Plant J*. **21**. 199-213.
- McCartney, A. W., Dyer, J. M., Dhanoa, P. K., Kim, P. K., Andrews, D. W., McNew, J. A. y Mullen, R. T.** 2004. Membrane-bound fatty acid desaturases are inserted co-translationally into the ER and contain different ER retrieval motifs at their carboxy termini. *The Plant Journal*. **37**. 156-173.
- McConn, M., Bell, E., Browse, J., Creelman, R. A. y Mullet, J. E.** 1997. Jasmonate is essential for insect defense in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**. 5473-7.
- McConn, M. y Browse, J.** 1996. The critical requirement for linolenic acid is pollen development, not photosynthesis, in an Arabidopsis mutant. *Plant Cell*. **8**. 403-416.
- McConn, M., Hugly, S., Browse, J. y Somerville, C.** 1994. A mutation at the FAD8 locus of Arabidopsis identifies a second chloroplast omega-3 desaturase. *Plant Phys*. **106**. 1609-1614.
- McCourt, P., Browse, J., Watson, J., Arntzen, C. J. y Somerville, C. R.** 1985. Analysis of photosynthetic antenna function in a mutant of *Arabidopsis thaliana* (L.) lacking trans-hexadecenoic acid. *Plant Phys*. **78**. 853-858.
- McCourt, P., Kunst, L., Browse, J. y Somerville, C. R.** 1987. The effects of reduced amounts of lipid unsaturation on chloroplast ultrastructure and photosynthesis in a mutant of Arabidopsis. *Plant Phys*. **84**. 353-60.
- McKeon, T. A. y Stumpf, P. K.** 1982. Purification and characterization of the stearyl-acyl carrier protein desaturase and the acyl-acyl carrier protein thioesterase from maturing seeds of safflower. *J. Biol. Chem*. **257**. 2141-2147.
- Meijer, H. J. G. y Munnik, T.** 2003. Phospholipid-based signaling in plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **54**. 265-306.
- Meyer, A., Kirsch, H., Domergue, F., Abbadi, A. y Sperling, P.** 2004. Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosahexaenoic acid biosynthesis. *J. Lipid Res*. **45**. 1899-1909.
- Miege, C., Marechal, E., Shimojima, M., Awai, K. y Block, M. A.** 1999. Biochemical and topological properties of type A MGDG synthase, a spinach chloroplast envelope enzyme catalyzing the synthesis of both prokaryotic and eukaryotic MGDG. *Eur. J. Biochem*. **265**. 990-1001.
- Mifflin, B., Napier, J. y Shewry, P.** 1999. Improving plant product quality. *Nat. Biotechnol*. **17**. BV13-BV14.

- Miquel, M. y Browse, J.** 1992. Arabidopsis mutants deficient in polyunsaturated fatty-acid synthesis. Biochemical and genetic characterization of a plant oleoyl-phosphatidylcholine desaturase. *J. Biol. Chem.* **267**. 1502-1509.
- Miquel, M. y Browse, J.** 1998. Arabidopsis lipids: A fat chance. *Plant Physiol. Biochem.* **36**. 187-197.
- Miquel, M., James, D., Dooner, H. y Browse, J.** 1993. Arabidopsis requires polyunsaturated lipids for low temperature survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**. 6208-6212.
- Mitchell, A. G. y Martin, C. E.** 1995. A novel cytochrome b5 domain is linked to the carboxyl-terminus of the *Saccharomyces cerevisiae* delta-9 fatty acid desaturase. *J. Biol. Chem.* **270**. 29766-29772.
- Mitra, S., Walters, B., Clouse, S. y Goshe, M.** 2009. An efficient organic solvent based extraction method for the proteomic analysis of Arabidopsis plasma membranes. *Journal of proteome research.* **8**. 2752-2767.
- Mongrand, S., Bessoule, J. J., Cabantous, F. y Cassagne, C.** 1998. The C-16 : 3/C-18 : 3 fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species. *Phytochemistry.* **49**. 1049-1064.
- Mongrand, S., Cassagne, C. y Bessoule, J. J.** 2000. Import of lyso-phosphatidylcholine into chloroplasts likely at the origin of eukaryotic plastidial lipids. *Plant Phys.* **122**. 845-852.
- Mongrand, S., Morel, J., Laroche, J., Claverol, S. y Carde, J. P.** 2004. Lipid rafts in higher plant cells - Purification and characterization of triton X-100-insoluble microdomains from tobacco plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **279**. 36277-36286.
- Moon, J., Parry, G. y Estelle, M.** 2004. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. *Plant Cell.* **16**. 3181-3195.
- Moreau, P., Bessoule, J. J., Mongrand, S., Testet, E. y Vincent, P.** 1998. Lipid trafficking in plant cells. *Prog. Lipid Res.* **37**. 371-391.
- Morre, D. J., Sellden, G., Sundqvist, C. y Sandelius, A. S.** 1991. Stromal low temperature compartment derived from the inner membrane of the chloroplast envelope. *Plant Phys.* **97**. 1558-1564.
- Mosblech, A., Thurow, C., Gatz, C., Feussner, I. y Heilmann, I.** 2011. Jasmonic acid perception by COI1 involves inositol polyphosphates in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **65**. 949-957.
- Mullet, J. E.** 1988. Chloroplast development and gene expression. *Annu. Rev. Plant. Phys.* **39**. 475-502.
- Murakami, Y., Tsuyama, M., Kobayashi, Y., Kodama, H. y Iba, K.** 2000. Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature. *Science.* **287**. 476-479.
- Murata, N.** 1983. Molecular species composition of phosphatidylglycerols from chilling sensitive and chilling resistant plants. *Plant & Cell Physiology.* **24**. 81-86.
- Murata, N., Ishizakinishizawa, Q., Higashi, S., Hayashi, H. y Tasaka, Y.** 1992. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature.* **356**. 710-713.
- Murata, N., Sato, N., Takahashi, N. y Hamazaki, Y.** 1982. Compositions and positional distributions of fatty-acids in phospholipids from leaves of

chilling sensitive and chilling resistant plants. *Plant & Cell Physiology*. **23**. 1071-1079.

Murata, N. y Yamaya, J. 1984. Temperature dependent phase behavior of phosphatidylglycerols from chilling sensitive and chilling resistant plants. *Plant Phys.* **74**. 1016-1024.

Mussig, C., Biesgen, C., Lisso, J., Uwer, U. y Weiler, E. W. 2000. A novel stress-inducible 12-oxophytodienoate reductase from *Arabidopsis thaliana* provides a potential link between Brassinosteroid-action and Jasmonic-acid synthesis. *J. Plant Physiol.* **157**. 143-152.

Nakamura, Y. 2013. Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants. *Prog. Lipid Res.* **52**. 43-50.

Napier, J. 2007. The production of unusual fatty acids in transgenic plants. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **58**. 295-319.

Napier, J. A., Michaelson, L. V. y Stobart, A. K. 1999. Plant desaturases: harvesting the fat of the land. *Curr. Opin. Plant. Biol.* **2**. 123-127.

Narváez-Vásquez, J., Florin-Christensen, J. y Ryan, C. A. 1999. Positional specificity of a phospholipase A activity induced by wounding, systemin, and oligosaccharide elicitors in tomato leaves. *Plant Cell*. **11**. 2249-2260.

Nelson, D. R. 1999. Cytochrome P450 and the individuality of species. *Archives of biochemistry and biophysics*. **369**. 1-10.

Nerlich, A., von Orlow, M., Rontein, D., Hanson, A. D. y Dörmann, P. 2007. Deficiency in phosphatidylserine decarboxylase activity in the *psd1 psd2 psd3* triple mutant of *Arabidopsis* affects phosphatidylethanolamine accumulation in mitochondria. *Plant Phys.* **144**. 904-914.

Nichols, B. W. 1968. Fatty acid metabolism in the chloroplast lipids of green and blue-green algae. *Lipids*. **3**. 354-360.

Nishida, Frentzen, M., Ishizaki, O. y Murata, N. 1987. Purification of isomeric forms of acyl-[acyl-carrier-protein]-glycerol-3-phosphate acyltransferase from greening squash cotyledons. *Plant & Cell Physiology*. **28**. 1071-1079.

Nishiuchi, T. y Iba, K. 1998. Roles of plastid omega-3 fatty acid desaturases in defense response of higher plants. *J. Plant Res.* **111**. 481-486.

Noordermeer, M. A., Veldink, G. A. y Vliegenthart, J. F. G. 2001. Fatty acid hydroperoxide lyase: A plant cytochrome P450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *ChemBioChem*. **2**. 494-504.

O'Quin, J., Bourassa, L., Zhang, D., Shockey, J. y Gidda, S. 2010. Temperature-sensitive post-translational regulation of plant omega-3 fatty-acid desaturases is mediated by the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *J. Biol. Chem.* **285**. 21781-21796.

Ohlrogge, J. y Browse, J. 1995. Lipid biosynthesis. *Plant Cell*. **7**. 957-70.

Ohlrogge, J. B., Browse, J. y Somerville, C. R. 1991. The genetics of plant lipids. *Biochim. Biophys. Acta. Lipids and lipid metabolism*. **1082**. 1-26.

Ohlrogge, J. B., Kuhn, D. N. y Stumpf, P. K. 1979. Subcellular localization of acyl-carrier protein in leaf protoplasts of *Spinacia oleracea*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **76**. 1194-1198.

Ohnishi, J. y Yamada, M. 1980. Glycerolipid synthesis in avena leaves during greening of etiolated seedlings. 1. Lipid changes in leaves. *Plant & Cell Physiology*. **21**. 1595-1606.

- Parchmann, S. y Mueller, M. J.** 1998. Evidence for the formation of dinor isoprostanes E-1 from alpha-linolenic acid in plants. *J. Biol. Chem.* **273**. 32650-32655.
- Park, J. H., Halitschke, R., Kim, H. B., Baldwin, I. T. y Feldmann, K. A.** 2002. A knock-out mutation in allene oxide synthase results in male sterility and defective wound signal transduction in Arabidopsis due to a block in jasmonic acid biosynthesis. *Plant J.* **31**. 1-12.
- Park, S. Y. y Lord, E. M.** 2003. Expression studies of SCA in lily and confirmation of its role in pollen tube adhesion. *Plant molecular biology.* **51**. 183-189.
- Parker Barnes, J. M., Das, T., Bobik, E., Leonard, A. E. y Thurmond, J. M.** 2000. Identification and characterization of an enzyme involved in the elongation of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**. 8284-8289.
- Peter, M.** 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. *Nature.* **191**. 144-148.
- Peter, M.** 1979. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science.* **206**. 1148-1159.
- Postbeittenmiller, D., Jaworski, J. G. y Ohlrogge, J. B.** 1991. *In vivo* pools of free and acylated acyl carrier proteins in spinach, evidence for sites of regulation of fatty acid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **266**. 1858-1865.
- Pulsifer, I., Kluge, S. y Rowland, O.** 2012. Arabidopsis LONG-CHAIN ACYL-COA SYNTHETASE 1 (LACS1), LACS2, and LACS3 facilitate fatty acid uptake in yeast. *Plant Physiol. Biochem.* **51**. 31-39.
- Raghothama, K. G.** 1999. Phosphate acquisition. *Annu. Rev. Plant. Phys.* **50**. 665-693.
- Reddy, A. S., Nuccio, M. L., Gross, L. M. y Thomas, T. L.** 1993. Isolation of a delta-6 desaturase gene from the cyanobacterium Synechocystis SP strain PCC 6803 by gain of function expression in Anabaena SP strain PCC 7120. *Plant molecular biology.* **22**. 293-300.
- Reymond, P., Weber, H., Damond, M. y Farmer, E. E.** 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in Arabidopsis. *Plant Cell.* **12**. 707-719.
- Ribot, C., Zimmerli, C., Farmer, E., Reymond, P. y Poirier, Y.** 2008. Induction of the Arabidopsis PHO1;H10 gene by 12-oxo-phytodienoic acid but not jasmonic acid via a CORONATINE INSENSITIVE1-dependent pathway. *Plant Phys.* **147**. 696-706.
- Rogers, S. M., Ogren, W. L. y Widholm, J. M.** 1987. Photosynthetic characteristics of a photoautotrophic cell suspension culture of soybean. *Plant Phys.* **84**. 1451-6.
- Román, A., Andreu, V., Luisa Hernández, M., Lagunas, B., Picorel, R., Hernandez, M. L., Martínez-Rivas, J. M. y Alfonso, M.** 2012. Contribution of the different omega-3 fatty acid desaturase genes to the cold response in soybean. *J. Exp. Bot.* **63**. 4973-82.
- Roston, R., Gao, J., Murcha, M., Whelan, J. y Benning, C.** 2012. TGD1,-2, and-3 proteins involved in lipid trafficking form ATP-binding cassette (ABC) transporter with multiple substrate-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **287**. 21406-21415.

- Roughan, P. G., Holland, R. y Slack, C. R.** 1980. The role of chloroplasts and microsomal fractions in polar lipid synthesis from [acetate-1-C-14] by cell-free preparations from spinach (*Spinacia oleracea*) leaves. *Biochem. J.* **188**. 17-24.
- Roughan, P. G. y Slack, C. R.** 1977. Long-chain acyl-coenzyme A synthetase activity of spinach chloroplasts is concentrated in envelope. *Biochem. J.* **162**. 457-459.
- Roughan, P. G. y Slack, C. R.** 1982. Cellular organization of glycerolipid metabolism. *Annual review of plant physiology.* **33**. 97-132.
- Roy, S., Pouenat, M. L., Caumont, C., Cariven, C. y Prevost, M. C.** 1995. Phospholipase activity and phospholipid patterns in tobacco cells treated with fungal elicitor. *Plant sci.* **107**. 17-25.
- Ruelland, E., Vaultier, M.-N., Zachowski, A. y Hurry, V.** 2009. Cold signalling and cold acclimation in plants. *ADVANCES IN BOTANICAL RESEARCH, VOL 49.* **49**. 35-150.
- Ruelland, E. y Zachowski, A.** 2010. How plants sense temperature. *Environ. Exp. Bot.* **69**. 225-232.
- Ruiz Lopez, N., Sayanova, O., Napier, J. y Haslam, R.** 2012. Metabolic engineering of the omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway into transgenic plants. *J. Exp. Bot.* **63**. 2397-2410.
- Ruppel, N., Logsdon, C., Whippo, C., Inoue, K. y Hangarter, R.** 2011. A mutation in *Arabidopsis* SEEDLING PLASTID DEVELOPMENT1 affects plastid differentiation in embryo-derived tissues during seedling growth. *Plant Phys.* **155**. 342-353.
- Rylott, E. L., Eastmond, P. J., Gilday, A. D., Slocombe, S. P. y Larson, T. R.** 2006. The *Arabidopsis thaliana* multifunctional protein gene (MFP2) of peroxisomal beta-oxidation is essential for seedling establishment. *Plant J.* **45**. 930-941.
- Saeed, A., Hagabati, N., Braisted, J., Liang, W. y Sharov, V.** 2006. TM4 microarray software suite. *DNA Microarrays, Part B: Databases and Statistics.* **411**. 134-+.
- Samuels, L., Kunst, L. y Jetter, R.** 2008. Sealing plant surfaces: Cuticular wax formation by epidermal cells. *Annu. Rev. Plant. Biol.* **59**. 683-707.
- Sanz, A., Moreno, J. I. y Castresana, C.** 1998. PIOX, a new pathogen-induced oxygenase with homology to animal cyclooxygenase. *Plant Cell.* **10**. 1523-1537.
- Sato, N., Hagio, M., Wada, H. y Tsuzuki, M.** 2000. Requirement of phosphatidylglycerol for photosynthetic function in thylakoid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**. 10655-10660.
- Sayanova, O., Smith, M. A., Lapinskas, P., Stobart, A. K. y Dobson, G.** 1997. Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b(5) domain results in the accumulation of high levels of Delta(6)-desaturated fatty acids in transgenic tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**. 4211-4216.
- Schaller, A. y Stintzi, A.** 2009. Enzymes in jasmonate biosynthesis - Structure, function, regulation. *Phytochemistry.* **70**. 1532-1538.
- Schaller, F.** 2001. Enzymes of the biosynthesis of octadecanoid-derived signalling molecules. *J. Exp. Bot.* **52**. 11-23.

- Schaller, F., Biesgen, C., Mussig, C., Altmann, T. y Weiler, E. W.** 2000. 12-oxophytodienoate reductase 3 (OPR3) is the isoenzyme involved in jasmonate biosynthesis. *Planta*. **210**. 979-984.
- Schaller, F. y Weiler, E. W.** 1997. Molecular cloning and characterization of 12-oxophytodienoate reductase, an enzyme of the octadecanoid signaling pathway from *Arabidopsis thaliana* - Structural and functional relationship to yeast old yellow enzyme. *J. Biol. Chem.* **272**. 28066-28072.
- Schaller, F., Zerbe, P., Reinbothe, S., Reinbothe, C. y Hofmann, E.** 2008. The allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana* - localization and cyclization. *The FEBS journal*. **275**. 2428-2441.
- Schilmiller, A. y Howe, G.** 2007. Functional diversification of acyl-coenzyme A oxidases in jasmonic acid biosynthesis and action. *Plant Phys.* **143**. 812-824.
- Schmid, M., Davison, T. S., Henz, S. R., Pape, U. J. y Demar, M.** 2005. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. *Nat. Genet.* **37**. 501-506.
- Schmidt, H., Dresselhaus, T., Buck, F. y Heinz, E.** 1994. Purification and PCR-based cDNA cloning of a plastidial n-6 desaturase. *Plant molecular biology*. **26**. 631-642.
- Schmidt, H. y Heinz, E.** 1990a. Desaturation of eoleoyl groups in envelope membranes from spinach chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**. 9477-9480.
- Schmidt, H. y Heinz, E.** 1990b. Involvement of Ferredoxin in desaturation of lipid-bound oleate in chloroplasts. *Plant Phys.* **94**. 214-220.
- Schmidt, H. y Heinz, E.** 1993. Direct desaturation of intact galactolipids by a desaturase solubilized from spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast envelopes. *Biochem. J.* **289**. 777-782.
- Schnurr, J., Shockey, J., de Boer, G.-J. y Browse, J.** 2002. Fatty acid export from the chloroplast. Molecular characterization of a major plastidial acyl-coenzyme A synthetase from *Arabidopsis*. *Plant Phys.* **129**. 1700-9.
- Schultz, D. J., Cahoon, E. B., Shanklin, J., Craig, R. y Cox, Foster, D. L.** 1996. Expression of a Delta(9) 14:0-acyl carrier protein fatty acid desaturase gene is necessary for the production of omega(5) anacardic acids found in pest-resistant geranium (*Pelargonium xhortorum*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**. 8771-8775.
- Sebastian, T., Baldridge, R., Xu, P. y Graham, T.** 2012. Phospholipid flippases: Building asymmetric membranes and transport vesicles. *Biochim. Biophys. Acta. Molecular and cell biology of lipids*. **1821**. 1068-1077.
- Shanklin, J., Achim, C., Schmidt, H., Fox, B. G. y Munck, E.** 1997. Mossbauer studies of alkane omega-hydroxylase: Evidence for a diiron cluster in an integral-membrane enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**. 2981-2986.
- Shanklin, J. y Cahoon, E. B.** 1998a. Desaturation and related modifications of fatty acid. *Annual Review of Plant Physiology And Plant Molecular Biology*. **49**. 611-641.
- Shanklin, J. y Cahoon, E. B.** 1998b. Desaturation and related modifications of fatty acids. *Annu. Rev. Plant. Phys.* **49**. 611-641.

- Shanklin, J., Guy, J., Mishra, G. y Lindqvist, Y.** 2009. Desaturases: emerging models for understanding functional diversification of diiron-containing enzymes. *J. Biol. Chem.* **284**. 18559-18563.
- Shanklin, J. y Somerville, C.** 1991. Stearoyl-acyl-carrier protein desaturase from higher plants is structurally unrelated to the animal and fungal homologs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**. 2510-2514.
- Shanklin, J. y Whittle, E.** 2003. Evidence linking the *Pseudomonas oleovorans* alkane omega-hydroxylase, an integral membrane diiron enzyme, and the fatty acid desaturase family. *FEBS lett.* **545**. 188-192.
- Shanklin, J., Whittle, E. y Fox, B. G.** 1994. 8 histidine residues are catalytically essential in a membrane associated iron enzyme, stearoyl-CoA desaturase, and are conserved in alkane hydroxylase and xylene monooxygenase. *Biochemistry.* **33**. 12787-12794.
- Sheard, L., Tan, X., Mao, H., Withers, J., Ben Nissan, G., Hinds, T., Kobayashi, Y., Hsu, F.-F., Sharon, M., Browse, J., He, S., Rizo, J., Howe, G. y Zheng, N.** 2010. Jasmonate perception by inositol-phosphate-potentiated COI1-JAZ co-receptor. *Nature.* **468**. 400-5.
- Shimojima, M.** 2011. Biosynthesis and functions of the plant sulfolipid. *Prog. Lipid Res.* **50**. 234-239.
- Shockey, J., Fulda, M. y Browse, J.** 2002. Arabidopsis contains nine long-chain acyl-coenzyme A synthetase genes that participate in fatty acid and glycerolipid metabolism. *Plant Phys.* **129**. 1710-22.
- Siebertz, H. P. y Heinz, E.** 1977. Labeling experiments on origin of hexadecatrienoic and octa-decatrienoic acids in galactolipids from leaves. *Zeitschrift für Naturforschung. C, A journal of biosciences.* **32**. 193-205.
- Siebertz, H. P., Heinz, E., Joyard, J. y Douce, R.** 1980. Labeling *in vivo* and *in vitro* of molecular species of lipids from chloroplast envelopes and thylakoids. *Eur. J. Biochem.* **108**. 177-185.
- Simpson, E. E. y Williams, J. P.** 1979. Galactolipid synthesis in *Vicia faba* leaves. 4. Site(s) of fatty acid incorporation into the major glycerolipids. *Plant Phys.* **63**. 674-676.
- Slack, C. R. y Roughan, P. G.** 1975. Kinetics of incorporation *in vivo* of [C-14] acetate and [Carbon-C-14] dioxide into fatty acids of glycerolipids in developing leaves. *Biochem. J.* **152**. 217-228.
- Slack, C. R., Roughan, P. G. y Balasingham, N.** 1977. Labeling studies *in vivo* on metabolism of acyl and glycerol moieties of glycerolipids in developing maize leaf. *Biochem. J.* **162**. 289-296.
- Slack, C. R., Roughan, P. G. y Terpstra, J.** 1976. Some properties of a microsomal oleate desaturase from leaves. *Biochem. J.* **155**. 71-80.
- Slocombe, S. P., Piffanelli, P., Fairbairn, D., Bowra, S. y Hatzopoulos, P.** 1994. Temporal and tissue-specific regulation of a *Brassica napus* stearoyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Plant Phys.* **104**. 1167-1176.
- Somerville, C.** 2007. Biofuels. *Curr. Biol.* **17**. R115-R119.
- Somerville, C. y Browse, J.** 1991. Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes. *Science.* **252**. 80-7.
- Somerville, C., Browse, J., Jaworski, J. G. y Ohlrogge, J. B.** 2000a. Lipids. B. B. Buchanan, W. Gruissem y R. L. Jones. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologist. 456-527.

- Somerville, C., Browse, J., Jaworski, J. G. y Ohlrogge, J. B.** 2000b. Lipids. American society of Plant Physiologist.
- Somerville, C. R. y Bonetta, D.** 2001. Plants as factories for technical materials. *Plant Phys.* **125**. 168-171.
- Sparace, S. A. y Mudd, J. B.** 1982. Phosphatidylglycerol synthesis in spinach chloroplasts, characterization of the newly synthesized molecule. *Plant Phys.* **70**. 1260-1264.
- Sperling, P., Franke, S., Luthje, S. y Heinz, E.** 2005. Are glucocerebrosides the predominant sphingolipids in plant plasma membranes? *Plant Physiol. Biochem.* **43**. 1031-1038.
- Sperling, P., Schmidt, H. y Heinz, E.** 1995. A cytochrome b5 containing fusion protein similar to plant acyl lipid desaturases. *Eur. J. Biochem.* **232**. 798-805.
- Sperling, P., Ternes, P., Zank, T. K. y Heinz, E.** 2003. The evolution of desaturases. *Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids*. **68**. 73-95.
- Staswick, P.** 2009. The Tryptophan Conjugates of Jasmonic and Indole-3-Acetic Acids Are Endogenous Auxin Inhibitors. *Plant Phys.* **150**. 1310-1321.
- Staswick, P. E., Su, W. P. y Howell, S. H.** 1992. Methyl jasmonate inhibition of root growth and induction of a leaf protein are decreased in an *Arabidopsis thaliana* mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**. 6837-6840.
- Steindler, C., Matteucci, A., Sessa, G., Weimar, T., Ohgishi, M., Aoyama, T., Morelli, G. y Ruberti, I.** 1999. Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development*. **126**. 4235-45.
- Stenzel, Hause, B., Miersch, O., Kurz, T. y Maucher, H.** 2003. Jasmonate biosynthesis and the allene oxide cyclase family of *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*. **51**. 895-911.
- Stenzel, I., Otto, M., Delker, C., Kirmse, N., Schmidt, D., Miersch, O., Hause, B. y Wasternack, C.** 2012. ALLENE OXIDE CYCLASE (AOC) gene family members of *Arabidopsis thaliana*: tissue- and organ-specific promoter activities and *in vivo* heteromerization*. *J. Exp. Bot.* **63**. 6125-6138.
- Stintzi, A., Weber, H., Reymond, P., Browse, J. y Farmer, E. E.** 2001. Plant defense in the absence of jasmonic acid: the role of cyclopentenones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**. 12837-42.
- Stukey, J. E., McDonough, V. M. y Martin, C. E.** 1990. The *OLE1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta-9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearyl-CoA desaturase gene. *J. Biol. Chem.* **265**. 20144-20149.
- Stumpe, M., Kandzia, R., Gobel, C., Rosahl, S. y Feussner, I.** 2001. A pathogen-inducible divinyl ether synthase (CYP74D) from elicitor-treated potato suspension cells. *FEBS lett.* **507**. 371-376.
- Stymne, S. y Appelqvist, L. A.** 1978. Biosynthesis of linoleate from oleoyl-CoA via oleoyl-phosphatidylcholine in microsomes of developing safflower seeds. *Eur. J. Biochem.* **90**. 223-229.
- Stymne, S. y Appelqvist, L. A.** 1980. Biosynthesis of linoleate and alpha-linolenate in homogenates from developing soya bean cotyledons. *Plant science letters*. **17**. 287-294.

- Taha, R., Ismail, I. y Zainal, Z.** 2012. The stearyl-acyl-carrier-protein desaturase promoter (Des) from oil palm confers fruit-specific GUS expression in transgenic tomato. *J. Plant Physiol.* **169**. 1290-1300.
- Taki, N., Sasaki Sekimoto, Y., Obayashi, T., Kikuta, A. y Kobayashi, K.** 2005. 12-oxo-phytodienoic acid triggers expression of a distinct set of genes and plays a role in wound-induced gene expression in Arabidopsis. *Plant Phys.* **139**. 1268-1283.
- Tang, G. Q., Novitzky, W. P., Griffin, H. C., Huber, S. C. y Dewey, R. E.** 2005. Oleate desaturase enzymes of soybean: evidence of regulation through differential stability and phosphorylation. *Plant J.* **44**. 433-446.
- Testerink, C. y Munnik, T.** 2011. Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants. *J. Exp. Bot.* **62**. 2349-2361.
- Theodoulou, F. L., Job, K., Slocombe, S. P., Footitt, S. y Holdsworth, M.** 2005. Jasmonoic acid levels are reduced in COMATOSE ATP-binding cassette transporter mutants. Implications for transport of jasmonate precursors into peroxisomes. *Plant Phys.* **137**. 835-840.
- Tilton, G. B., Shockey, J. M. y Browse, J.** 2004. Biochemical and molecular characterization of ACH2, an acyl-CoA thioesterase from *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* **279**. 7487-7494.
- Torres Franklin, M.-L., Repellin, A., Huynh, V.-B., d'Arcy Lameta, A. y Zuily Fodil, Y.** 2009. Omega-3 fatty acid desaturase (*FAD3*, *FAD7*, *FAD8*) gene expression and linolenic acid content in cowpea leaves submitted to drought and after rehydration. *Environ. Exp. Bot.* **65**. 162-169.
- Tsuboi, S., Osafune, T., Tsugeki, R., Nishimura, M. y Yamada, M.** 1992. Nonspecific lipid transfer protein in Castor bean cotyledon cells, subcellular localization and possible role in lipid metabolism. *Journal of Biochemistry.* **111**. 500-508.
- Tsukaya, H.** 1995. Developmental genetics of leaf morphogenesis in dicotyledonous plants. *J. Plant Res.* **108**. 407-416.
- Van Brocklyn, J. R. y Williams, J. B.** 2012. The control of the balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase: Oxidative stress and the seesaw of cell survival and death. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* **163**. 26-36.
- Vanbesouw, A. y Wintermans, J.** 1978. Galactolipid formation in chloroplast envelopes. 2. Evidence for two mechanism in galactosylation. *Biochim. Biophys. Acta. Lipids and lipid metabolism.* **529**. 44-53.
- Vancanneyt, G., Sanz, C., Farmaki, T., Paneque, M. y Ortego, F.** 2001. Hydroperoxide lyase depletion in transgenic potato plants leads to an increase in aphid performance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**. 8139-8144.
- Vance, V. y Vaucheret, H.** 2001. RNA silencing in plants-defense and counterdefense. *Science.* **292**. 2277-2280.
- Vaucheret, H., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F. y Godon, C.** 1998. Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J.* **16**. 651-659.
- Vaultier, M.-N., Cantrel, C., Vergnolle, C., Justin, A.-M. y Demandre, C.** 2006. Desaturase mutants reveal that membrane rigidification acts as a cold perception mechanism upstream of the diacylglycerol kinase pathway in Arabidopsis cells. *FEBS lett.* **580**. 4218-4223.

- Vellosillo, T., Martinez, M., Lopez, M., Vicente, J. y Cascon, T.** 2007. Oxylinpkins produced by the 9-lipoxygenase pathway in Arabidopsis regulate lateral root development and defense responses through a specific signaling cascade. *Plant Cell*. **19**. 831-846.
- Venegas-Calern, M., Sayanova, O. y Napier, J. A.** 2010. An alternative to fish oils: Metabolic engineering of oil-seed crops to produce omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Prog. Lipid Res.* **49**. 108-119.
- Vick, B. A. y Zimmerman, D. C.** 1987. Pathways of fatty-acid hydroperoxide metabolism in spinach leaf chloroplasts. *Plant Phys.* **85**. 1073-1078.
- Villena, J. F., Dominguez, E., Stewart, D. y Heredia, A.** 1999. Characterization and biosynthesis of non-degradable polymers in plant cuticles. *Planta*. **208**. 181-187.
- Vrinten, P., Hu, Z. Y., Munchinsky, M. A., Rowland, G. y Qiu, X.** 2005. Two FAD3 desaturase genes control the level of linolenic acid in flax seed. *Plant Phys.* **139**. 79-87.
- Wallis, J. y Browse, J.** 2002. Mutants of Arabidopsis reveal many roles for membrane lipids. *Prog. Lipid Res.* **41**. 254-78.
- Wang, Y. J., Li, Y. D., Luo, G. Z., Tian, A. G. y Wang, H. W.** 2005. Cloning and characterization of an HDZip I gene *GmHZ1* from soybean. *Planta*. **221**. 831-843.
- Wang, Z., Xu, C. y Benning, C.** 2012. TGD4 involved in endoplasmic reticulum-to-chloroplast lipid trafficking is a phosphatidic acid binding protein. *Plant J.* **70**. 614-623.
- Weaire, P. J. y Kekwick, R. G. O.** 1975. Synthesis of fatty-acids in avocado mesocarp and cauliflower bud tissue. *Biochem. J.* **146**.
- Weber, H., Chetelat, A., Caldelari, D. y Farmer, E. E.** 1999. Divinyl ether fatty acid synthesis in late blight-diseased potato leaves. *Plant Cell*. **11**. 485-493.
- Weber, H., Vick, B. A. y Farmer, E. E.** 1997. Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**. 10473-10478.
- Weichert, H., Stenzel, I., Berndt, E., Wasternack, C. y Feussner, I.** 1999. Metabolic profiling of oxylinpkins upon salicylate treatment in barley leaves - preferential induction of the reductase pathway by salicylate. *FEBS lett.* **464**. 133-137.
- Westphal, S., Heins, L., Soll, J. y Vothknecht, U. C.** 2001. Vipp1 deletion mutant of Synechocystis: A connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**. 4243-4248.
- Williams, C. M. y Burdge, G.** 2006. Long-chain n-3 PUFA: plant vs. marine sources. *P. Nutr. Soc.* **65**. 42-50.
- Williams, J. P. y Khan, M. U.** 1982. Lipid biosynthesis in Brassica napus leaves. 1. C-14-labeling kinetics of the fatty-acids of the major glycerollipids. *Biochim. Biophys. Acta. Lipids and lipid metabolism*. **713**. 177-184.
- Xu, C., Fan, J., Cornish, A. y Benning, C.** 2008. Lipid trafficking between the endoplasmic reticulum and the plastid in Arabidopsis requires the extraplastidic TGD4 protein. *Plant Cell*. **20**. 2190-2204.
- Xu, C. C., Fan, J., Froehlich, J. E., Awai, K. y Benning, C.** 2005. Mutation of the TGD1 chloroplast envelope protein affects phosphatidate metabolism in Arabidopsis. *Plant Cell*. **17**. 3094-3110.

- Xu, C. C., Fan, J. L., Riekhof, W., Froehlich, J. E. y Benning, C.** 2003. A permease-like protein involved in ER to thylakoid lipid transfer in Arabidopsis. *EMBO J.* **22**. 2370-2379.
- Yamaoka, Y., Yu, Y., Mizoi, J., Fujiki, Y. y Saito, K.** 2011. PHOSPHATIDYLSERINE SYNTHASE1 is required for microspore development in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **67**. 648-661.
- Yu, B. y Benning, C.** 2003. Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in Arabidopsis. *Plant J.* **36**. 762-770.
- Zolman, B. K., Silva, I. D. y Bartel, B.** 2001. The Arabidopsis *pxa1* mutant is defective in an ATP-binding cassette transporter-like protein required for peroxisomal fatty acid beta-oxidation. *Plant Phys.* **127**. 1266-1278.